

THÈSE

**Etude des réactions des dérivés guanidiques
avec des alpha-dicétones.
Application à la mesure de l'activité
de la créatinéphosphokinase.**

Présentée à la Faculté de Pharmacie de Nancy

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE (Doctorat d'Etat)

par **Françoise ROOS**

Pharmacien

Titulaire des Certificats d'Etudes Supérieures

de Chimie Biologique, Biochimie Générale, Biochimie Appliquée

des Certificats d'Etudes Spéciales

de Biochimie Pharmaceutique et Technique, Hématologie, Sérologie

Assistante, Déléguée Chef de Travaux à la Faculté de Pharmacie de Nancy

née le 25 Janvier 1938, à Epinal (Vosges).

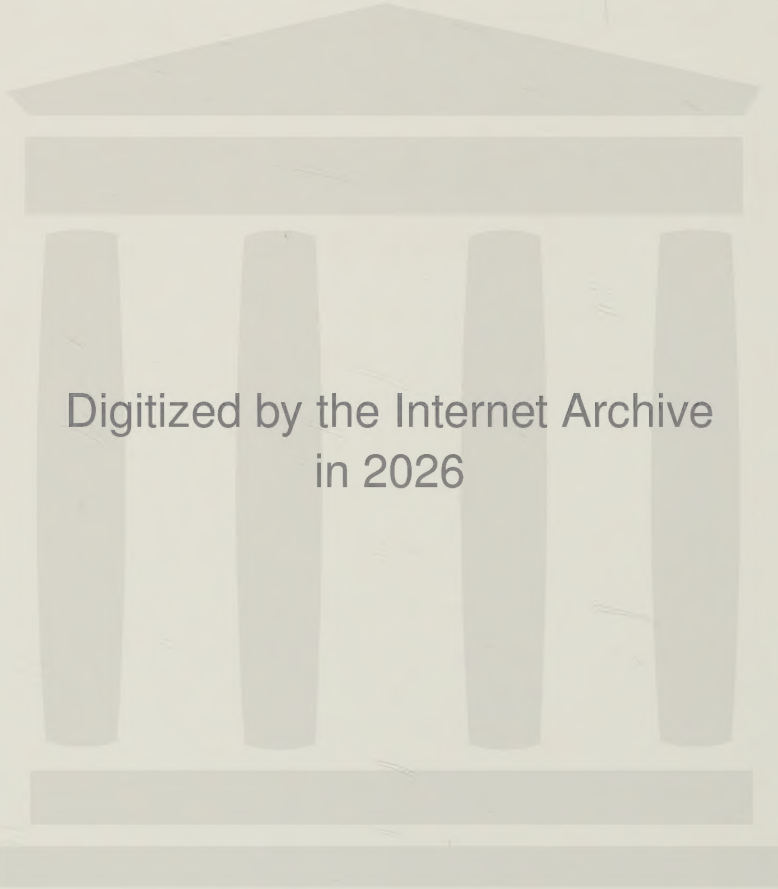
Soutenue le 1^{er} Mars 1969, devant la Commission d'Examen.

Examineurs de la Thèse ;

Président : M. le Professeur **PIERFITTE**

Juges : Mlle le Professeur **BESSON**

M. **SIEST**, Maître de Conférences (Délégué)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555002_0018

PUBLICATIONS DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

FACULTÉ DE PHARMACIE

THÈSE

**Etude des réactions des dérivés guanidiques
avec des alpha-dicétones.
Application à la mesure de l'activité
de la créatinéphosphokinase.**

Présentée à la Faculté de Pharmacie de Nancy

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE (Doctorat d'Etat)

par **Françoise ROOS**

Pharmacien

Titulaire des Certificats d'Etudes Supérieures

de Chimie Biologique, Biochimie Générale, Biochimie Appliquée

des Certificats d'Etudes Spéciales

de Biochimie Pharmaceutique et Technique, Hématologie, Sérologie

Assistante, Déléguée Chef de Travaux à la Faculté de Pharmacie de Nancy

née le 25 Janvier 1938, à Epinal (Vosges).

Soutenue le 1^{er} Mars 1969, devant la Commission d'Examen.

Examineurs de la Thèse ;

Président : M. le Professeur **PIERFITTE**

Juges : Mlle le Professeur **BESSON**

M. **SIEST**, Maître de Conférences (Délégué)

VERBAAL VAN DE VERGADERING VAN DE

RAAD VAN TOEGANGELIJKHEID

1881

Etude des réactions des électrolytes avec des sels d'acide Application à la mesure de l'activité de la cristallisation.

PAR M. J. VAN DER WOUDE, Docteur en Sciences.

Présentée à la Faculté des Sciences.

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR.

PAR M. J. VAN DER WOUDE.

LEIDEN.

Imprimerie de J. J. van der Woude.

De Christelijke Universiteit te Leiden, Faculté des Sciences.

Le 15 Mars 1881.

La Faculté des Sciences a reçu de M. J. van der Woude, Docteur en Sciences, une thèse intitulée:

Etude des réactions des électrolytes avec des sels d'acide.

Application à la mesure de l'activité de la cristallisation.

La Faculté des Sciences a décidé d'accepter cette thèse pour l'obtention du grade de Docteur.

Le 15 Mars 1881.

Le Recteur de l'Université, J. J. van der Woude.

Le Vice-Recteur, J. J. van der Woude.

Le Secrétaire, J. J. van der Woude.

ADMINISTRATION

Doyen : Professeur A. BERNANOSE

Assesseur : Professeur R. BENE

Secrétaire Principal : B. SEUROT

Doyen honoraire : M. RICHARD
Recteur de l'Académie de TOULOUSE

Professeurs honoraires : M. CORDEBARD
M. FRANQUET

Maître de Conférences honoraire : M. ANZIANI

PERSONNEL ENSEIGNANTProfesseurs

M.	MEUNIER A.	Pharmacie galénique
Melle	FRANCOIS M. Th.	Matière médicale
MM.	MARCHAL J.G.	Microbiologie
	STEIMETZ E.	Sciences naturelles
	SOLEIL J.	Pharmacie chimique
	BERNANOSE A.	Physique
Melle	BESSON S.	Pharmacodynamie
MM.	BENE R.	Sciences biologiques (Zoologie, Biologie, Parasitologie, Hématologie)
	MIRJOLET M.	Chimie analytique et toxicologie
	PIERFITTE M.	Chimie biologique
	PELT J.M.	Biologie végétale et cryptogamie

Maître de Conférences Agrégé

M. MARTIN J.A. Chimie minérale et minéralogie

Maîtres de Conférences Délégués

Melle GIRARD Th.	Hygiène
MM. HAYON J.C.	Matière médicale et botanique
JOUANY J.M.	Toxicologie
SCHWARTZBROD L.	Microbiologie
SIEST G.	Chimie biologique

Chargés de Cours Complémentaires

MM. BERNANOSE A.	Diplôme d'Etat d'Audioprothésiste
MEUNIER A.	Hydrologie, Hydrologie thermique
MARCHAL J.G.	C.E.S. Immunologie
STEIMETZ E.	Mycologie, Microchimie
SOLEIL J.	C.E.S. Pharmacotechnie chimique
MIRJOLET M.	C.E.S. Chimie biologique, Méthodes physiques et chimiques d'analyse
PIERFITTE M.	C.E.S. Chimie biologique
PELT J.M.	C.E.S. Mycologie
MARTIN J.A.	Travaux dirigés de Chimie générale et minérale
Melle GIRARD Th.	C.E.S. Mycologie
MM. HAYON J.C.	C.E.S. Mycologie
SCHWARTZBROD L.	C.E.S. Immunologie
Mme LASSEUR A.	C.E.S. Immunologie
MM. AIMOND P.	Diplôme d'Etat d'Audioprothésiste
LOPPINET V.	Chimie organique
Mme BALDO S.	C.E.S. Immunologie
MM. HOFFMAN M.	Pharmacie galénique industrielle
LECTARD P.	C.E.S. Mycologie
ANZIANI P.	Synthèse organique
BOYER P.	Notions de mathématiques appliquées aux sciences expérimentales - Physique -
CALAMAI	Diplôme d'Etat d'Audioprothésiste
COINUS	Eléments de séméiologie et de pathologie générale
DIVOUX	Gestion et comptabilité
GAUDRON	Reconnaissances de pharmacie chimique et galénique
	Pharmacie galénique (conférences)

MM.	GREGOIRE	Législation - Législation pharmaceu- tique et sociale
	GRIMAUD	Diplôme d'Etat d'Audioprothésiste
	HACHET	Diplôme d'Etat d'Audioprothésiste
	HOUPLON	Génie pharmaceutique
	KREEL	Eléments de séméiologie et de pathologie générale
	LAGARDE	Génie pharmaceutique
	LARCAN	Législation pharmaceutique et sociale
	MEYER	Eléments de séméiologie et de patho- logie générale
		Gestion et comptabilité

Chefs de Travaux Pratiques

Mme	LASSEUR A.	(Titulaire)	Microbiologie
MM.	AIMOND P.	"	Chimie analytique quantitative
	LOPPINET V.	"	Pharmacotechnie chimique
	BAUDOT Ph.	(Stagiaire)	Chimie minérale et organique
	DIXNEUF P.	"	Physique
	HOFFMAN M.	"	Pharmacie galénique
Mme	BALDO S.	(Déléguée)	Microbiologie
Melle	BARRET F.	"	Zoologie
Mme	BROCHET Ch.	"	Sciences pharmaceutiques
MM.	JACQUE M.	"	Pharmacodynamie
	LECTARD P.	"	Micrographie
Melle	PANEK E.	"	Chimie biologique
Melle	ROOS F.	"	Biochimie
Melle	GIRARD Th.	(Chargée)	Secourisme

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver, ni les imputer.

MEIS ET AMICIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur PIERFITTE

Professeur de Chimie Biologique

A NOS JUGES

Mademoiselle le Professeur BESSON

Professeur de Pharmacodynamie

Monsieur SIEST

Maître de Conférences Délégué

A MONSIEUR LE DOYEN BERNANOSE

Professeur de Physique

A TOUS NOS MAITRES

De la Faculté de Pharmacie de NANCY

AVANT - PROPOS

Ce travail a été effectué sous la direction de Monsieur SIEST qui nous a toujours prodigué ses conseils éclairés et qui a su nous faire profiter de sa haute compétence en Biochimie. Son dynamisme, son sens très aigü de la critique ont toujours été pour nous le meilleur stimulant. Qu'il en soit remercié et que cette thèse soit le témoignage de notre profonde reconnaissance.

Nous remercions Monsieur le Professeur PIERFITTE d'avoir bien voulu accepter de présider le Jury de cette thèse. Il nous a toujours accueillie avec bienveillance dans son laboratoire et ses conseils, fruits d'une longue expérience, nous ont toujours été très précieux. Nous l'assurons de notre profond respect et lui témoignons toute notre gratitude.

Nos remerciements vont également à Mademoiselle le Professeur BESSON qui, à la fin de notre scolarité, nous a initiée à la recherche et qui très libéralement nous a permis de nous orienter vers la Biochimie. Nous conserverons toujours un excellent souvenir de notre séjour dans son laboratoire. Nous lui exprimons notre vive reconnaissance et l'assurons de notre respectueuse affection.

Nous ne saurions oublier nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie qui pendant nos études nous ont prodigué leur enseignement et leurs conseils. Nous les prions de croire à notre respectueuse gratitude.

Que tous ceux qui nous ont aidée à réaliser ce Travail trouvent ici l'expression de notre sincère reconnaissance.

INTRODUCTION

L'étude des réactions colorées des dérivés guanidiques fait suite à celle des réactions des dérivés carbamidés. Les guanidines réagissent en effet en milieu alcalin avec les alpha-dicétones et en particulier avec le dioxo-2,3 butane (diacétyl), réactif de l'urée en milieu acide.

L'étude détaillée des meilleures conditions de réaction, et surtout la connaissance de toutes les possibilités d'erreurs et d'interférence, nous ont permis d'aborder avec rigueur les applications à l'enzymologie. Nous avons en effet utilisé ces réactions colorées pour la mesure de l'activité d'une enzyme : la créatinephosphokinase (CPK).

L'intérêt clinique des dosages enzymatiques n'est plus à démontrer. Quelle que soit l'étiologie d'une maladie, infectieuse, traumatique ou congénitale, les troubles résultent souvent de l'altération de systèmes enzymatiques et en ce sens PAULING déclarait "que toute maladie est une maladie métabolique".

La mesure de la CPK représente, du fait de sa localisation particulière, un excellent moyen de diagnostic spécifique de l'infarctus du myocarde ou des maladies musculaires.

L'étude de la CPK présente un second intérêt tout aussi important et passionnant : elle nous a fait entrer dans le domaine de la biochimie moléculaire. En effet l'existence de plusieurs formes moléculaires pour cette enzyme soulève les problèmes actuels complexes de la régulation des voies métaboliques au niveau des enzymes.

Deux processus essentiels de régulation intracellulaire ont été mis en évidence au cours de ces dernières années :

- la régulation de la synthèse des enzymes par un mécanisme d'information génétique au niveau de l'ADN chromosomique.

- la régulation de l'activité des enzymes par des petites molécules d'effecteurs en général allostérique.

Pour les organismes pluricellulaires, où il est nécessaire de coordonner les activités de cellules différentes, ce double système

est complété par des régulations hormonales et nerveuses qui maintiennent chaque cellule, à chaque instant, à un niveau d'activité métabolique comparable avec celui des autres.

Pourquoi existe-t'il alors pour certaines enzymes des formes moléculaires différentes appelées isoenzymes ?

Les processus rappelés précédemment sont-ils encore insuffisants ou est-il possible de faire entrer les isoenzymes dans l'un de ces systèmes de régulation avec une sensibilité à certains effecteurs variable selon la forme moléculaire ?

C'est ce que nous avons tenté d'aborder en étudiant l'effet des sels et de l'insuline sur des fractions de CPK séparées et plus ou moins purifiées par chromatographie d'échange d'ions.

PLAN DU TRAVAIL

INTRODUCTION GENERALE

PREMIERE PARTIE : Etude des réactions colorées entre les dérivés guanidiques et les alpha-dicétones.
Comparaison avec une réaction fluorescente à la ninhydrine.

INTRODUCTION.-

Chapitre premier : Réaction créatine-dioxo-2,3 butane.

Chapitre deuxième : Essais de différents adjuvants pour améliorer la réaction créatine-dioxo-2,3 butane

- solvants organiques
- sels métalliques
- composés à caractère oxydant ou réducteur
- substances intensifiantes

Chapitre troisième : Intérêt de l'addition d'orcinol et de glucuronolactone à la réaction créatine-dioxo-2,3 butane.

Chapitre quatrième : Réaction créatine-dioxo-2,3, phényl-3 propane

- réaction créatine-dioxo-2,3, phényl-3 propane
- action des composés modifiant la réaction
- réaction créatine-dioxo-2,3, phényl-3 propane en présence d'orcinol et de glucuronolactone

Chapitre cinquième : Nouvelle réaction colorée créatine-dioxo-2,3 pentane

Chapitre sixième : Etude comparative des réactions colorées et fluorimétriques guanidine - dicétones. Méthodes manuelle et automatique.

- réaction fluorimétrique créatine-ninhydrine
- comparaison des réactions guanidines - dicétones
- adaptation des réactions colorées guanidines alpha-dicétones à l'analyse en flux continu.

Chapitre septième : Données sur la nature des complexes colorés et fluorescents.

DEUXIEME PARTIE : Etude de la créatinephosphokinase.

INTRODUCTION.-

Chapitre huitième : Données actuelles sur les différentes formes de créatinephosphokinase.

Chapitre neuvième : Mesure globale de l'activité de la créatinephosphokinase sérique.

- Méthodes existantes
- Mise au point d'une méthode manuelle de mesure de la créatinephosphokinase
- Adaptation à l'analyse en flux continu
- Discussion des méthodes de dosage
- Résultats

Chapitre dixième : Séparation électrophorétique des isoenzymes de la créatinephosphokinase du sérum.

Chapitre onzième : Chromatographie des formes moléculaires multiples de créatinephosphokinase.

Chapitre douzième : Influence des ions sur l'activité enzymatique.

Chapitre treizième : Effet de l'insuline sur l'activité in vitro de la créatinephosphokinase.

CONCLUSIONS GENERALES.

ABBREVIATIONS UTILISEES

A.D.P.	Acide adénosine diphosphorique
A.T.P.	Acide adénosine triphosphorique
B.M.B.	Bain marie bouillant
C.P.	Créatinephosphate
C.P.K.	Créatinephosphokinase
DB	Dioxo-2,3 butane
D.O.	Densité optique
DP	Dioxo-2,3 pentane
DPP	Dioxo-2,3, phényl-3 propane
G6PD	Glucose-6 phosphate deshydrogénase
LDH	Deshydrogénase lactique
UM	Micromole
NAD	Diphosphonucléotide d'adénine et de nicotinamide
NADP	Triphosphonucléotide d'adénine et de nicotinamide
nM	Nanomole
nm	Nanomètre ($1 \text{ nm} = 10 \text{ \AA}$)
PEP	Phosphoénolpyruvate
PK	Pyruvate kinase
UF	Unités de fluorescence

PREMIERE PARTIE

ETUDE DES REACTIONS COLOREES ENTRE LES DERIVES GUANIDIQUES ET LES

ALPHA-DICETONES

COMPARAISON AVEC UNE REACTION FLUORESCENTE A LA NINHYDRINE

Introduction :

Les alpha-dicétones réagissent en milieu alcalin avec les dérivés guanidiques comme les dérivés carbamidés en milieu acide (1).

La réaction en milieu alcalin a été utilisée d'une part pour la recherche des dicétones, d'autre part pour le dosage des composés guanidiques.

On trouve l'origine de ces techniques dans l'observation de VOGES et PROSKAUER (2) qui avaient remarqué que l'addition de potasse dans le milieu de culture de certaines bactéries provoquait l'apparition d'une coloration rose fluorescente, plus intense à la surface du tube.

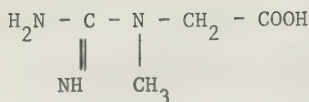
HARDEN (3) montrait que cette réaction était due à la présence dans le milieu d'un composé : l'oxo-2, ol-3 butane (acétylméthylcarbinol) $\text{CH}_3 - \text{CHOH} - \text{CO} - \text{CH}_3$ et son produit d'oxydation : le dioxo-2,3 butane (diacétyl) : $\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{CO} - \text{CH}_3$. L'eau peptonée était avec la potasse, nécessaire au développement de la coloration.

Six ans plus tard, HARDEN et NORRIS (4) identifiaient le composé de l'eau peptonée responsable de la coloration : un dérivé guanidique, l'arginine contenue dans les protéines. Ces auteurs vérifiaient la réactivité de toute une série de composés guanidiques et en particulier celle de la créatine.

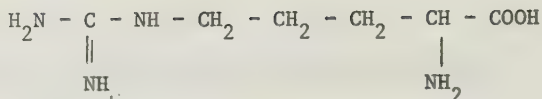
Le dioxo-2,3 butane donne en effet une réaction intense avec la créatine, propriété qui fut mise à profit par O'MEARA (5) pour sensibiliser la réaction de VOGES - PROSKAUER.

BARRITT (6) par addition d'alpha-naphtol améliorait encore très nettement la sensibilité de la réaction qui a été reprise par WESTERFELD (7) pour doser l'acétylméthylcarbinol dans le sang.

Simultanément de nombreux auteurs appliquaient cette réaction à l'étude dans les milieux biologiques des dérivés guanidiques et en particulier créatine et arginine



créatine



arginine

WALPOLE (8), EGGLETON (9) et DULIERE (10) l'utilisaient pour l'estimation de la créatine dans l'urine et le muscle. Mais ce n'est qu'après l'introduction d'alpha-naphtol que des techniques valables furent mises au point, en particulier, pour la créatine celles de EGGLETON et coll. (11), RAAFLAUB et ABELIN (12), ENNOR et STOCKEN (13), et pour l'arginine celle de ROSENBERG et coll. (14).

L'application de la réaction colorée au dosage des composés guanidiques dans les tissus, le sang ou l'urine, se heurtait à deux difficultés : la présence de substances inhibitrices et le manque de spécificité de la technique. Les améliorations apportées ont donc cherché à palier à ces deux inconvénients :

- soit en éliminant les composés inhibiteurs par addition de chloro-4 mercuribenzoate de sodium (15,16).
- soit en isolant préalablement les guanidines par passage sur charbon (17) ou sur résines échangeuses d'ions (18,19).
- soit encore par un artifice de calcul (20,21).

La réaction de BARRITT a été également appliquée en chromatographie à la révélation des guanidines (22, 23, 24, 25, 26, 27) ou des dicétones et de leurs précurseurs (28).

A présent, ces méthodes comme beaucoup d'autres, ont été adaptées à l'analyse automatique (16,29).

Une autre alpha-dicétone, le dioxo-2,3 phényl-3 propane (phénylpropanedione) $\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CO} - \text{CO} - \text{CH}_3$ a été proposée en 1929 par DULIERE (10) pour remplacer le dioxo-2,3 butane. Elle a été utilisée par LANG (30) pour doser la créatine et l'arginine, et par IRREVERRE et EVANS (31) d'une part, SMITH (27) d'autre part comme révélateur des guanidines en chromatographie.

Dès 1932, LANG (30), contrôlant la réactivité de nombreuses dicétones ou composés apparentés émettait l'hypothèse suivante : les dicétones réactives doivent être des alpha dicétones possédant un groupement méthyle terminal.

Afin de vérifier l'hypothèse de LANG, nous avons utilisé de nombreuses dicétones (voir chapitre VII) Ces essais nous ont permis de mettre en évidence une réaction nouvelle avec le dioxo-2,3 pentane.

Ainsi trois alpha-dicétones donnent des complexes colorés susceptibles d'être utilisés pour doser les dérivés guanidiques : le dioxo-2,3 butane, le dioxo-2,3 phényl-3 propane et le dioxo-2,3 pentane

Nous les étudieront successivement.

La créatine réagit également en milieu alcalin, avec la ninhydrine en donnant une fluorescence verte.

La mise au point de méthodes fluorimétriques de dosage des guanidines est assez récente.

Etudiant les modifications physiques et physico-chimiques des protéines, F. FAURE (32) signale l'apparition d'une fluorescence lorsque les protéines sont traitées par la ninhydrine. Trois ans plus tard, (33), elle définit les conditions de développement de la fluorescence et identifie l'acide aminé responsable de la réaction : l'arginine.

CONN et DAVIS (34), d'autre part mettent aussi en évidence une réaction fluorescente entre les dérivés guanidiques et la ninhydrine et l'appliquent bientôt au dosage de la créatine dans les milieux biologiques (35).

Actuellement les réactions colorées et fluorescentes de la créatine ont été adoptées à la mesure de l'activité de la créatinephosphokinase (C P K).

Mais avant d'aborder l'étude de la réaction enzymatique, nous allons auparavant reprendre celle des réactions colorées et fluorescentes de la créatine.

C H A P I T R E I

REACTION CREATINE-DIOXO-2,3 BUTANE

Introduction :

WALPOLE (8) le premier appliqua au dosage de la créatine, la réaction des alpha-dicétones avec les dérivés guanidiques. Depuis, de nombreuses techniques furent mises au point. L'amélioration essentielle fut l'addition d'alpha-naphtol. Le tableau 1 rassemble les principales méthodes de dosage de la créatine. Plusieurs d'entre elles furent appliquées à la mesure de l'activité de la créatine-phosphokinase sérique.

Les variations portent sur la concentration en alpha-naphtol, en dioxo-2,3 butane, la nature de l'alcali, la température et le temps de développement de la coloration.

Nous avons repris l'étude de la réaction et recherché ses conditions optima en prenant comme base de départ les conditions de RAAFLAUB et ABELIN (12) qui avec celles d'EGGLETON (11) sont le plus souvent citées en référence

Afin de rendre les résultats comparatifs, les réactions ont été développées au bain-marie à 37° pendant 15 minutes dans un volume final arbitrairement choisi de 6 ml (1). La prise d'essai est de 200 nanomoles de créatine. Après 10 minutes de refroidissement les densités optiques sont mesurées au maximum d'absorption (520 nm).

I - Dioxo-2,3 butane

Le dioxo-2,3 butane ou diacétyle est un produit souvent impur et de conservation difficile. De nombreux auteurs préparent une solution stock de dicétone à partir de la dioxime : hydrolyse en milieu sulfurique puis distillation. ANDERSON et coll. (18) purifient le dioxo-2,3 butane par distillation en éliminant les fractions de tête et de queue. KANIG (20) comparant les colorations obtenues avec la dicétone non traitée et avec le produit distillé constate que les colorations sont légèrement plus intenses mais plus lentes à se développer avec le produit purifié.

TABLEAU : I
METHODES COLORIMETRIQUES DE DOSAGE DE LA CREATINE

	Volume final (ml)	Concentration en dioxo-2,3 butane (mg/ml)	Réactif alcalin	Concentration en alpha-naphtol (mg/ml)	Temps et température de développement de la coloration
WALPOLE (8) 1911	6	III gouttes sol. 1%	Na ₂ CO ₃ saturé	0	1 mn - BMB
DULIERE (10) 1929	4 à 10	II gouttes sol. 1%	Na ₂ CO ₃ saturé	0	60 mn à 28°
EGGLETON et coll. (11) 1943	10	0,05	NaOH 1,5 N + Na ₂ CO ₃ saturé	2	30 mn à 20°
RAAFLAUF et ABELIN (12) 1950	10	0,05	NaOH 1,5 N	2	30 et 60 mn à 20°
ENNOR et STOCKEN (13) 1953	10	0,05	NaOH 1,5 N ++ Na ₂ CO ₃ saturé	16	18 - 36 mn à 20°
CHAPPELL et PERRY (36) 1954	10	0,05	NaOH 1,5 N + Na ₂ CO ₃ saturé	2	30 mn à 20°
SOLVONUCK (37) 1956	5	0,05	NaOH 1,5 N + Na ₂ CO ₃ saturé	2	20 mn à 20°
ANDERSON et coll. (18) 1957	10	0,05	NaOH 1,5 N + Na ₂ CO ₃ saturé	1,6	20 - 30 mn à 20°
KANIG (20) 1957	10	0,05	NaOH 0,5 N	2	45 mn à 20°
DREYFUS et SCHAPIRA (38) 1961	5	0,04	NaOH 1,5 N + Na ₂ CO ₃ saturé	2	20 mn à 20°
GERBER et coll. (17) 1961	2,9	0,03	NaOH 1,5 N + Na ₂ CO ₃ saturé	2,06	10 mn à 20°
KUROHARA (19) 1961	10	0,05	NaOH 1,5 N + Na ₂ CO ₃ saturé	3	7 à 10 mn à 20°
ROZBERG (39) 1962	5	0,4	NaOH 1,5 N + Na ₂ CO ₃ saturé	2	20 mn à 20°
HUGHES (40) 1962	10	0,05	NaOH 1,5 N + Na ₂ CO ₃ saturé	16	60 mn à 37°
GRIFFITHS (16) 1964	méthode automatique	0,12 mg/mn	NaOH 1,5 N + Na ₂ CO ₃ saturé	4,8 mg/mn	25°
NICHOL (41) 1964	10	0,0075	NaOH 1,5 N + Na ₂ CO ₃ saturé	0,3	60 mn à 37°
LAURER (21) 1966	2,8	0,035	NaOH 2 N	15 mg	15 et 30 mn à 20°
SIEGEL et COHEN (42) 1966	méthode automatique	0,8 mg/mn	NaOH 1,5 N + Na ₂ CO ₃ saturé	30 mg/mn	20°
FLEISCHER (43) 1967	méthode automatique	0,24 mg/mn	NaOH 2 N + NaCl	18,96 mg/mn	37°
MENACHE et GAIST (44) 1967	2,5	0,032	NaOH 1,5 N + Na ₂ CO ₃ saturé	1,6	30 mn à 25°
STERBA et DURAFFOUD (45) 1968	1,5	0,08	NaOH 1,5 N + Na ₂ CO ₃ saturé	4	30 mn à 20°

Nous avons utilisé du dioxo-2,3 butane Fluka après avoir vérifié que la distillation n'apportait aucune amélioration.

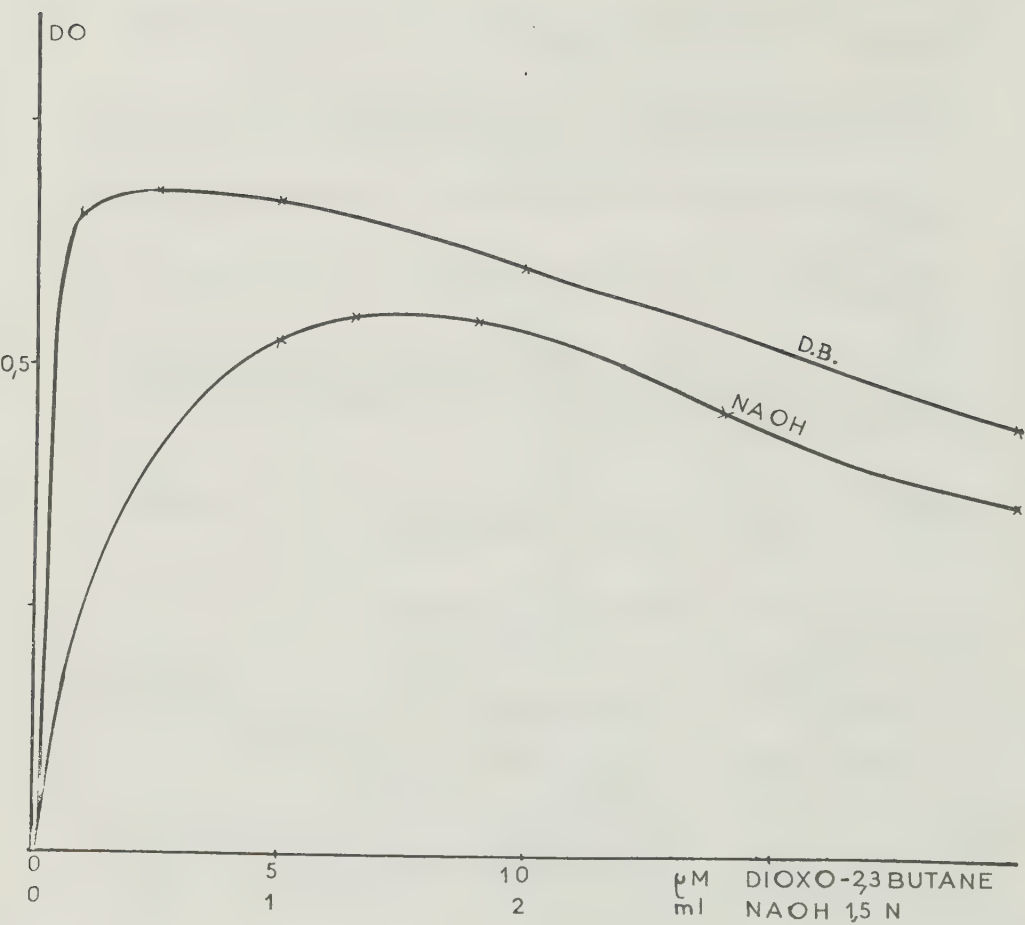
L'examen du graphique 1 et du tableau 2 représentant les variations de l'intensité des colorations en fonction de la concentration en dicétone permet de tirer les conclusions suivantes :

- Une faible concentration en dicétone suffit à développer une coloration.
- Les conditions optima ne sont pas critiques : 1 à 7,5 micromoles de dioxo-2,3 butane.
- Les témoins réactifs sont colorés : le dioxo-2,3 butane donne en effet en milieu alcalin une coloration brune parasite, maximum à 410 nm. Cette réaction secondaire serait due à la polymérisation du dioxo-2,3 butane en milieu alcalin (8).

Tableau 2 : Intensité des colorations en fonction de la concentration en dioxo-2,3 butane (créatine 200 n M)

Dioxo-2,3 butane micromoles	0,1	0,2	0,5	1	2,5	5	7,5	10	20
D.O. Dosage	0,25	0,41	0,63	0,67	0,68	0,68	0,65	0,60	0,44
D.O. Témoin Réactif	0,09	0,09	0,10	0,10	0,10	0,10	0,13	0,15	0,28

Nous avons adopté une concentration conduisant à une réaction intense avec un témoin réactif encore faible : 5 micromoles. Cette concentration correspondant à 0,07 mg/ml est légèrement supérieure à celle utilisée par d'autres (tableau 1).



Graphique 1 Réaction créatine-dioxo-2,3 butane-alpha-naphtol : Intensité des colorations en fonction de la concentration en dioxo-2,3 butane et en NaOH.

2 - Alcalinité

La réaction créatine-dicétone ne se développe qu'en milieu alcalin : NaOH à diverses concentrations, carbonate de sodium en solution saturée, KOH (tableau 1). Le réactif le plus usité est un mélange de soude et de solution saturée de carbonate de sodium.

Les solutions de NaOH ou KOH permettent de dissoudre l'alpha-naphtol, insoluble en milieu neutre. Mais cette alcalinité présente l'inconvénient d'accélérer la transformation de la créatinine en créatine, et limite la spécificité de la méthode.

Nous avons étudié l'influence de l'alcalinité sur la coloration avec NaOH puis nous avons tenté de remplacer NaOH par d'autres bases.

Il apparaît dans le graphique 1 représentant l'intensité des colorations en fonction de l'alcalinité que la réaction est partiellement inhibée par NaOH en excès.

Comme pour le dioxo-2,3 butane, la concentration optima n'est pas critique et l'intensité est maxima pour 1 à 2 ml de NaOH 0,75 N.

Nous avons obtenu des résultats similaires en opérant à 20° ou 45° et après différents temps de bain-marie.

Les essais réalisés avec d'autres bases sont résumés dans le tableau 3 : nous avons testé les bases suivantes :

- KOH 0,75 N
- mélange NaOH 1,5 N + Na_2CO_3 en solution saturée
- mélange NaOH 1,5 N + Li_2CO_3 en solution saturée
- KCN 10%
- NH_4OH pure
- Ethylène diamine pure
- Baryte en solution saturée.

De ces essais nous pouvons conclure que :

- les solutions de KOH sont équivalentes à celles de NaOH de même molarité.

- le réactif le plus couramment préconisé : NaOH 1,5 N + Na_2CO_3 saturé, plus alcalin conduit à des colorations plus faibles.

- nous confirmons les résultats de RAAFLAUB et ABELIN (12) et de KANIG (29) indiquant que l'addition de Na_2CO_3 est superflue.

- l'introduction d'alpha naphtol ne permet plus d'utiliser la solution saturée de Na_2CO_3 , premier alcalin préconisé, car ce phénol est insoluble dans un tel milieu.

Les mêmes inconvénients sont à noter avec Li_2CO_3 .

- l'action inhibitrice de NH_4OH était discutée : forte pour WALPOLE (4), nulle pour ROSENBERG et coll. (14). Lors de notre expérimentation, nous avons retrouvé une inhibition de 30%.

A la suite de ces essais, nous utilisons NaOH 0,75 N.

Tableau 3 : Intensité de la réaction avec différentes bases
(créatine 200 n M)

ALCALINS	D. O.
NaOH 0,75 N	0,56
KOH 0,75 N	0,55
NaOH 1,5 N + Na_2CO_3 saturé	0,43
NaOH 1,5 N + Li_2CO_3 saturé	0,44
KCN 10%	0,40
NH_4OH	0,38
Ethylène diamine	0,08
Baryte saturée	précipitation

3 - Alpha-naphtol

L'addition d'alpha-naphtol préconisée par BARRITT (6) sensibilise très nettement la réaction. Son rôle n'a pas été élucidé : BARRITT

a seulement constaté que l'addition d'alpha-naphtol après le réactif alcalin ne modifiait pas la coloration alors qu'il obtenait une intensification marquée, si l'adjuvant était introduit avant l'alcalin.

On sait aussi d'après les travaux d'EGGLETON et coll. (11) que l'activité n'est pas due aux impuretés du réactif puisque l'alpha-naphtol purifié par trois distillations successives a le même pouvoir intensifiant.

L'alpha-naphtol est un produit insoluble dans l'eau. Il n'est soluble qu'en milieu alcoolique ou alcalin. BARRITT utilise une solution éthanolique ; dans les autres cas, l'alpha-naphtol est dissous dans le réactif alcalin. Cette solution doit être préparée extemporanément car elle brunit rapidement.

Comme précédemment, nous en avons défini la concentration optima.

Tableau 4 : Intensité des colorations en fonction de la concentration en alpha-naphtol (créatine 200 n M)

alpha-naphtol (mg)	0	20	40	60	80	100
témoin	0,03	0,08	0,10	0,13	0,15	0,16
dosage	0,01	0,50	0,56	0,56	0,60	0,60

L'étude des variations de la coloration en fonction du taux d'alpha-naphtol (tableau 4) montre que 40 mg représentent la quantité optima à introduire dans le milieu. Une augmentation de la concentration entraîne une intensification du témoin réactif sans beaucoup améliorer la réaction colorée. Cette concentration correspondant à 6,6 mg/ml est supérieure à celles généralement utilisées.

L'addition d'alpha-naphtol a un double but :

D'une part la sensibilité de la réaction a été décuplée : sans intensifiant et dans des conditions optima de concentration en dioxo-2,3 butane et en alcalin, on ne peut déceler moins de 50 microgrammes de créatine ; dans le second cas, on peut doser une quantité de créatine 10 fois plus faible.

D'autre part la spécificité de la méthode est meilleure : la réaction initiale sans intensifiant nécessite une forte alcalinité (3 ml NaOH 40 %) qui favorise la transformation de la créatinine en créatine. En présence d'alpha-naphtol au contraire, l'alcalinité beaucoup plus faible réduit cette réaction secondaire.

4 - Cinétique - Stabilité

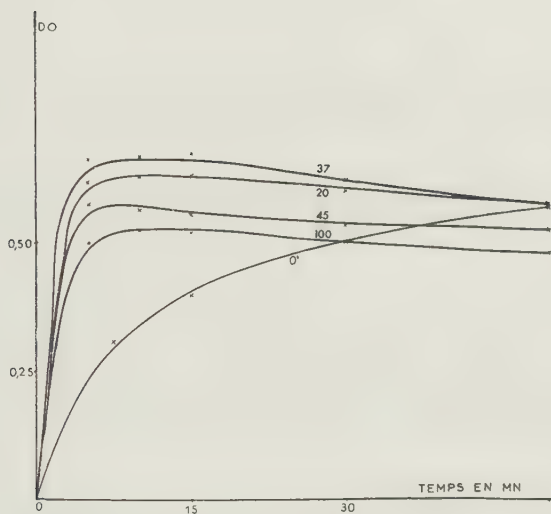
La réaction est généralement développée à 20°. Mais KANIG (20) a montré que le chauffage accélérerait le développement de la coloration, améliorerait sa stabilité sans trop diminuer son intensité.

Nous avons étudié la cinétique et la stabilité des colorations à des températures bien définies : 0° - 20° - 37° - 45° - 100°. Le graphique 2 représentant l'intensité des colorations en fonction du temps de chauffage et de la température, montre que sauf à 0° la réaction se développe rapidement. Il n'est pas nécessaire de prolonger le chauffage au delà de 10 minutes.

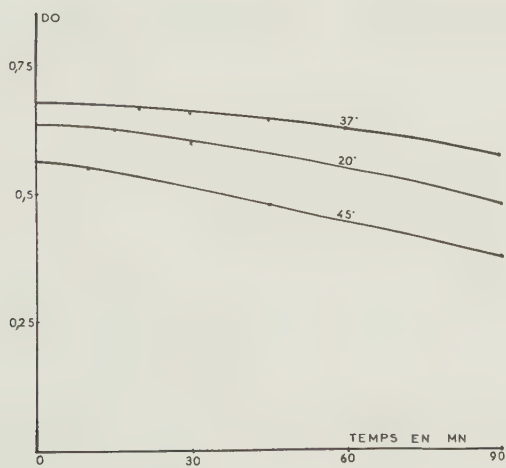
Tableau 5 : Intensité de la réaction et des témoins réactifs en fonction de la température (créatine 200 n M)

Température	0°	20°	37°	45°	100°
Témoin réactif	0,08	0,12	0,12	0,23	0,25
Dosage	0,38	0,65	0,68	0,55	0,51

Le chauffage ne modifie pas la cinétique de la réaction qui reste de même ordre quelque soit la température (sauf à 0° où elle est plus lente). Mais la température influe sur l'intensité de la réaction qui est optima à 37°. L'augmentation de la température intensifie la coloration parasite du dioxo-2,3 butane en milieu alcalin (tableau 5). Contrairement aux résultats de KANIG, nous avons obtenu des colorations légèrement plus intenses à 37° qu'à 20°. Il ne faut cependant pas augmenter la température au delà de 37°, les colorations obtenues étant alors plus faibles.



Graphique 2 Réaction créatine-dioxo-2,3 butane - alpha-naphtol :
Cinétique de la réaction colorée à différentes
températures.



Graphique 3 Réaction créatine-dioxo-2,3 butane - alpha-naphtol :
Stabilité des colorations en fonction de la température.

Nous avons également vérifié qu'à 37° la concentration en dioxo-2,3 butane ou l'alcalinité ne modifiaient pas la cinétique de la réaction mais seulement son intensité.

La stabilité des colorations varie avec chaque technique : elle serait de 2 H pour EGGLETON et coll. (11), 1 H pour RAAFLAUB et ABELIN (12) mais serait parfois réduite à 10 minutes (19).

Pour notre part, nous avons étudié la stabilité de la réaction développée avec des concentrations optima de réactifs à 20°, 37° et 45°. On constate d'après le graphique 3 que l'intensité des colorations diminue assez rapidement mais que le chauffage à 37° améliore la stabilité. La coloration développée à 37° baisse de 8 % en 60 minutes ; la stabilité est deux fois moins importante si la réaction est développée à 20° ou à 45°.

Nous développerons la réaction à 37° car le chauffage accélère la réaction, intensifie la coloration et apporte une meilleure stabilité.

CONCLUSIONS

Nous avons montré que pour un volume final de 6 ml, les concentrations optima étaient les suivantes :

- dioxo-2,3 butane 5 micromoles
- alpha-naphtol 40 mg
- NaOH 1,5 millimoles

Temps de développement de la coloration : 10 minutes à 37°. Lecture à 520 nm après 10 minutes.

Pour intensifier la réaction, nous avons choisi des concentrations en dioxo-2,3 butane et en alpha-naphtol légèrement supérieures à celles habituellement préconisées.

Mais nous avons réduit la durée de développement de la coloration à 10 minutes et nous avons augmenté la stabilité de la réaction en opérant à 37°.

Nous avons enfin accru la spécificité de la technique : la diminution de l'alcalinité du milieu et la réduction de la durée du développement de la coloration, limitent en effet la conversion créatinine - créatine.

CH A P I T R E I I

ESSAIS DE DIFFERENTS ADJUVANTS POUR AMELIORER

LA REACTION CREATINE - DIOXO-2,3 BUTANE

La réaction des dérivés carbamidés avec le dioxo-2,3 butane en milieu acide est améliorée par l'emploi de nombreux composés (1). Nous avons repris la réaction en milieu alcalin et nous avons examiné l'influence éventuelle des quatre groupes de composés testés en milieu acide :

- solvants
- sels métalliques
- composés à caractère oxydant ou réducteur
- substances intensifiant les réactions colorées.

Il nous faut noter que l'effet de certains solvants et de quelques intensifiants avait déjà été signalé sur la réaction développée en milieu alcalin.

1 - SOLVANTS ORGANIQUES

En 1956, l'action des alcools a été bien étudiée par ROSENBERG et coll. (14) dans une mise au point d'une technique de dosage de l'arginine. Pour cet auteur, le propanol intensifie et stabilise la coloration du dioxo-2,3 butane et des guanidines monosubstituées (arginine) alors qu'elle abaisse celle des guanidines disubstituées asymétriques (créatine).

Nous avons limité l'étude des solvants à la réaction créatine-alpha-dicétone.

D'après le tableau 6, on constate que tous les alcools testés inhibent la réaction colorée. Le méthanol et l'éthylène-glycol ont un pouvoir inhibiteur marqué ; l'action de l'éthanol est plus faible, le propanol enfin est le composé le moins actif.

Tableau 6 : Intensité de la réaction créatine-dioxo-2,3 butane
en présence de solvants (créatine 200 n M)

Solvants (ml)	0	0,5	1
Méthanol	0,64	0,41	0,30
Ethanol	0,64	0,58	0,52
Propanol	0,64	0,62	0,60
Ethylène-glycol	0,64	0,38	0,28
Acétone	0,64	0,60	non miscible
Dioxane	0,64	0,61	0,52
Ethylméthylcétone	0,64	0,34	0,21
Méthylal	0,64	0,60	0,56

La stabilité des colorations n'est pas améliorée en milieu alcoolique : le tableau 7 représentant la baisse des colorations indique que seul l'éthylène-glycol apporte une stabilisation relative. Mais cet alcool est inhibiteur.

Les autres solvants inhibent également la coloration. Le méthylal, le dioxane et l'acétone sont peu actifs ; l'inhibition est plus forte avec l'éthylméthylcétone. De plus, ce dernier composé ainsi que l'acétone donnent par eux-mêmes, une coloration jaune.

Tableau 7 : Stabilité des colorations développées en milieu alcoolique
(résultats exprimés en % de diminution de densité optique)

Alcools	Après 1 H	Après 3 H
Néant	12 %	39 %
Méthanol	9 %	38 %
Ethanol	13 %	40 %
Propanol	11 %	39 %
Ethylène-glycol	3 %	16 %

Conclusions :

Aucun des solvants essayés n'améliore la sensibilité de la réaction colorée.

L'intensification apportée par le propanol dans le dosage de l'arginine ne se retrouve pas pour la créatine. L'addition d'alcool dans le milieu qui permettrait de remplacer la solution alcaline d'alpha-naphtol de préparation extemporanée par une solution alcoolique beaucoup plus stable, se révèle donc néfaste à la spécificité de la réaction.

2 - SELS METALLIQUES

L'influence des sels métalliques en milieu alcalin n'a jamais été mentionnée. Mais on connaît l'action intensifiante de certains cations sur la réaction développée en milieu acide (1).

Nous avons testé les sels métalliques suivants :

- argent ⁺ (nitrate)
- cobalt ⁺⁺ (nitrate)
- cuivre ⁺⁺ (sulfate)
- fer ⁺⁺⁺ (perchlorure)
- mercure ⁺⁺ (chlorure)
- nickel ⁺⁺ (sulfate)
- zinc ⁺⁺ (sulfate)

Ils ont été introduits dans le milieu réactionnel en solution 0,1 M, 0,01 M et 0,001 M.

Résultats :

- en solution 0,1 M et souvent 0,01 M, tous les métaux précipitent sous forme d'hydroxydes.
- le nitrate de cobalt inhibe la coloration même en solution 0,0002 M.
- les sels de cobalt et de cuivre donnent une coloration parasite par eux-mêmes.

En milieu alcalin, la réaction colorée ne peut donc être améliorée par l'introduction de cations métalliques.

3 - COMPOSES A CARACTERE OXYDANT OU REDUCTEUR

VOGES et PROSKAUER (2) avaient remarqué que la coloration rouge apparue après addition de potasse dans le milieu de culture de certaines bactéries était plus intense à la surface du liquide. Les travaux d'EGGLETON et coll. (11) ont prouvé que la coloration ne se développait pas après un séjour dans une atmosphère d'hydrogène privée d'oxygène, mais qu'elle apparaissait dès l'exposition à l'air.

Ces observations nous ont incitée à connaître le rôle des oxydants ou des réducteurs sur la réaction.

a - Dérivés à caractère oxydant

Nous avons étudié l'activité des composés suivants :

- Acide arsénique purifié Prolabo
- Arséniate de sodium R-P
- Chloramine T
- Chlorate de sodium pur Prolabo
- Ferricyanure de potassium R-P
- Nitrate de sodium R-P
- Permanganate de potassium R-P

Nous avons introduit dans le milieu réactionnel 0,5, 5 et 50 micromoles de chacun des composés.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 8.

En milieu alcalin, le pouvoir oxydant de certains de ces dérivés est faible ; seuls la chloramine, le ferricyanure et le permanganate de potassium sont rapidement réductibles (46).

Tableau 8 : Intensité des colorations en présence de divers oxydants (créatine 200 nM)

Solutions d'oxydants (micromoles)	0	0,5	5	50
Acide arsénique	0,64	0,62	0,60	0,51
Arséniate de sodium	0,64	0,69	0,70	0,71
Chloramine T	0,64	0,56	0,50	0,46
Chlorate de sodium	0,64	0,62	0,65	0,63
Ferricyanure de potassium	0,64	0,63	0,64	0,43
Nitrate de sodium	0,64	0,68	0,68	0,68

On constate uniquement une action inhibitrice avec la chloramine et le ferricyanure de potassium.

Ces deux composés, d'autre part, donnent par eux-mêmes, une réaction secondaire qui intensifie fortement les témoins réactifs.

La stabilité des colorations n'est pas modifiée par l'introduction d'oxydants dans le milieu réactionnel.

Nous n'avons pas représenté dans le tableau 8 les résultats obtenus avec le permanganate de potassium. En solution 0,1 et 0,01 M il se produit un précipité ; à des concentrations inférieures, on note une légère inhibition.

b - Composés réducteurs

L'étude des composés suivants a été conduite comme celle des substances oxydantes :

- Acide ascorbique Merck
- Hydroquinone Merck
- Hydroxylamine chlorhydrate R-P
- Hydrazine sulfate R-P
- Nitrite de sodium R-P
- Sulfite de sodium R-P

Dans le tableau 9 sont consignés les résultats obtenus :

- Aucun dérivé introduit n'intensifie la coloration et certaines substances inhibent fortement la réaction.

- Le nitrite de sodium et l'hydroquinone sont sans action. Ce dernier composé présente en milieu alcalin et en solution concentrée une coloration brune qui masque la coloration de la créatine.

- Les autres réducteurs, introduits dans le milieu réactionnel à raison de 0,5, 5 et 50 micromoles empêchent le développement de la coloration. En solution plus diluée, ils sont sans action. Le pouvoir inhibiteur varie avec les dérivés et l'acide ascorbique est le composé le plus actif.

Tableau 9 : Intensité des colorations en présence de composés réducteurs (créatine 200 nM)

Solutions réductrices (micromoles)	0	0,5	5	50
Acide ascorbique	0,62	0,62	0,33	0,10
Hydroquinone	0,62	0,63	0,61	coloration brune
Chlorhydrate d'hydroxylamine	0,62	0,63	coloration violette	coloration verte
Nitrite de sodium	0,62	0,64	0,63	0,63
Sulfite de sodium	0,62	0,64	0,51	0,23

Nous n'avons pas représenté dans le tableau 9, les résultats obtenus avec le sulfate d'hydrazine : en raison du manque de solubilité de ce composé, son activité n'a été testée qu'avec 0,5, 2,5 et 25 micromoles. Dans ces conditions, le pouvoir inhibiteur du sulfate d'hydrazine est comparable à celui du sulfite de sodium.

Il faut encore noter que le chlorhydrate d'hydroxylamine présente une coloration verte qui se superpose à la coloration habituelle de la créatine.

Comme pour les oxydants, nous avons étudié l'évolution des colorations après le chauffage.

Les composés inhibiteurs retardent le développement de la coloration qui s'intensifie après le bain-marie. Le graphique 4 représentant l'évolution des colorations en présence de concentrations variables d'acide ascorbique.

Avec 5 micromoles d'acide ascorbique, on obtient une coloration supérieure à celle du témoin ; mais cette intensification apparaît trop tardivement (2 heures) pour être aisément applicable.

Quand l'inhibition est moins importante (0,5 micromole) la coloration évolue comme celle du témoin.

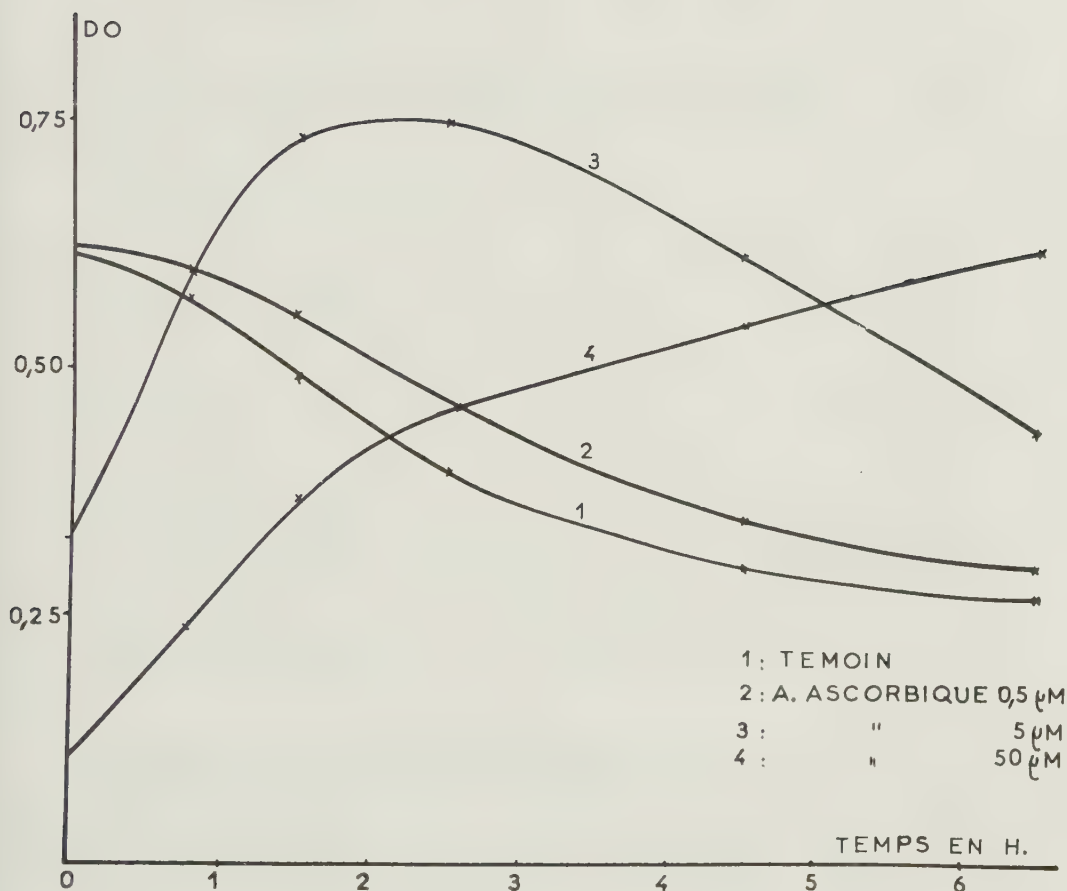
Nous avons tenté d'accélérer le développement de la coloration en augmentant la température et la durée de chauffage : nos essais ont été réalisés à 37°, 60° et au bain-marie bouillant, la durée du chauffage variant de 15 minutes à 2 heures. Les réactions se développent plus rapidement mais l'augmentation de la température conduit à des colorations plus faibles et à un brunissement plus important des témoins réactifs.

De plus, si les colorations ne sont pas entièrement développées après le bain-marie, elles s'intensifient encore après le chauffage sans que cela présente un intérêt particulier.

Il nous a paru intéressant d'étudier la réactivité d'un groupe de réducteurs particuliers : les composés possédant une fonction SH. Ces dérivés sont en effet utilisés dans le dosage de la créatine-kinase pour réactiver et régulariser l'activité enzymatique (voir deuxième partie). Or on sait depuis les travaux d'ENNOR et STOCKEN (13) que ces dérivés inhibent la réaction colorée de la créatine et du dioxo-2,3 butane.

Les essais d'ENNOR et STOCKEN ont été réalisés avec du glutathion et de la cystéine. Nous avons repris l'étude de ces deux dérivés et nous avons ajouté deux autres composés à groupement SH fréquemment utilisés aujourd'hui : le mercaptoéthanol et le dithiothreitol (réactif de Cléland's).

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 10.



Graphique 4 Réaction créatine-dioxo-2,3
 butane-alpha-naphtol : Stabi-
 lité des colorations en présence
 d'acide ascorbique.

On constate que tous les composés inhibent la coloration même aux faibles concentrations et que le dithiothreitol est le dérivé le moins actif.

Tableau 10 : Intensité des colorations en présence de réducteurs à fonction SH (créatine 200 n M)

Composés SH (micromoles)	0	0,5	5	50
Cystéine	0,66	0,33	0,03	0,01
Dithiothreitol	0,66	0,54	0,12	0,01
Glutathion	0,66	0,16	0,05	0,01
Mercaptoéthanol	0,66	0,20	0,10	0,01

Conclusions

Nous avons montré que certains dérivés à caractère oxydant ou réducteur inhibent les réactions colorées qui évoluent alors différemment.

Avec les oxydants, la coloration reste toujours inférieure à celle du témoin et baisse dans les mêmes proportions.

En présence d'un réducteur, au contraire, elle s'intensifie après le chauffage. Avec l'acide ascorbique, l'intensité maxima atteinte est supérieure à celle du témoin mais cette amélioration ne présente pas d'application pratique.

Comparant différents composés à fonction SH, nous avons montré que le moins inhibiteur était le dithiothreitol.

4 - SUBSTANCES INTENSIFIANTES

Les premiers essais d'intensification de la réaction créatine dioxo-2,3 butane ont été réalisés par BARRITT (6). Testant de nombreux dérivés et en particulier des phénols, BARRITT avait obtenu une légère intensification de la réaction avec le résorcinol et l'orcinol, un virage de la coloration à l'orangé avec le bétanaphтол et une très nette sensibilisation avec l'alpha-naphtol. Il concluait qu'en pratique, seul l'alpha-naphtol pouvait être utilisé. Depuis ces travaux, la méthode à l'alpha-naphtol est toujours employée pour doser les dérivés guanidiques.

Pour tenter d'améliorer encore la réaction, nous avons essayé de remplacer l'alpha-naphtol :

- par d'autres phénols
- par des dérivés présentant une analogie de structure avec les guanidines
- par des composés connus pour intensifier la réaction des dérivés carbamidés avec le dioxo-2,3 butane en milieu acide (1).

Comme nous l'avons noté dans la première partie de ce travail, l'addition d'alpha-naphtol modifie les conditions opératoires de la réaction : elle permet de diminuer les quantités de créatine, de dioxo-2,3 butane et d'alcalin dans le milieu réactionnel. C'est pourquoi nous avons étudié l'action des divers composés dans les deux conditions opératoires décrites ci-dessous :

Réactifs	Conditions A	Conditions B
Créatine (micromoles)	1	0,2
Dioxo-2,3 butane (micromoles)	15	5
Alcalinité finale	NaOH 5 N	NaOH 0,25 N

Afin d'avoir des résultats comparatifs, nous avons utilisé les différents composés en solutions molaires aqueuses ou si nécessaire alcooliques. Mais dans ce dernier cas l'activité des dérivés est difficilement interprétable : l'éthanol par son action inhibitrice peut masquer une faible augmentation des colorations et retarde la cinétique de la réaction colorée.

Dans le tableau 11 nous avons regroupé les composés selon leur activité, en signalant les cas où les dérivés étaient dissous dans l'éthanol (E).

- Certains dérivés sont toujours inhibiteurs : antipyrine, pyramidon, tryptophane, etc...

- Quelques produits ont une action variable avec les conditions opératoires : naphtol-2, naphtorésorcinol.

Les composés les plus intéressants sont :

- dans les premières conditions : le résorcinol, le naphtorésorcinol, l'urée, la thiourée, la phénylhydrazine, l'orcinol, le thiosemicarbazide.

- dans les conditions B : l'alpha et le bêta-naphtol, l'hydroxy-8-quinoléine, l'orcinol et le résorcinol.

Nous avons étudié avec plus de précision l'effet des composés les plus actifs.

a - INTENSIFIANTS EN MILIEU ALCALIN 5 N (CONDITIONS A)

1 - Action sur la réaction créatine - dioxo-2,3 butane

Nous avons déterminé les concentrations les plus favorables pour chaque dérivé. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 12.

L'urée et le résorcinol sont actifs à forte concentration. Avec le thiosemicarbazide, la thiourée ou le naphtorésorcinol, l'intensification est obtenue avec de faibles doses ; de plus, des quantités supérieures de thiosemicarbazide ou de thiourée inhibent la réaction.

TABLEAU 11 : ACTION DE DIFFERENTS COMPOSES SUR LA REACTION CREATINE -

DIOXO - 2,3 BUTANE

	CONDITIONS A	CONDITIONS B
<u>Inhibiteurs</u>	Acide phénylanthranilique (E) Benzonaphtol (E) Diméthylamino-4-phenazone (pyramidon) Hydroxy-8-quinoléine (E) Naphtol-2 (E) Naphtoquinone-1,2, sulfonate-4 de sodium Naphtylamine-1 (E) Naphtylamine-2 (E) Nitro-4-phenylhydrazine (E) Phénanthroline-1,10 (E) Phénazone (Antipyrine) Phloroglucinol (E) Thymol (E) Tryptophane Vanilline (E)	Acide phénylanthranilique (E) Acide sulfosalicylique Acide toluène sulfonique-4 Benzonaphtol (E) Diméthylamino-4-benzaldéhyde (E) Diméthylamino-4-phénazone (pyramidon) Diphénylamino-4 sulfonate-4 de sodium Lactone de l'acide glucuronique Naphtalènediol-1,3 (naphtorésorcinol) (E) Naphtylamine-1 (E) Naphtylamine-2 (E) Nitro-4 phénylhydrazine (E) Phénanthroline-1,10 (E) Phénazone (antipyrine) Phénol Phénylalanine Phénylhydrazine Phloroglucinol (E) Thiosemicarbazide Thiourée Tryptophane Tyrosine (A) Urée Vanilline (E)
<u>Dérivés inactifs</u>	Acide sulfosalicylique Diphénylamino-4-sulfonate-4 de sodium Lactone de l'acide glucuronique Phénol Phénylalanine	
<u>Intensifiants</u>	Acide toluène sulfonique-4 Naphtol-1 (E) Naphtalènediol-1,3 (E) (Naphtorésorcinol) Orcinol Phénylhydrazine Résorcinol Thiosemicarbazide Thiourée Tyrosine (A) Urée	Hydroxy-8 quinoléine (E) Naphtol-1 (E) Naphtol-2 (E) Orcinol Résorcinol

Tableau 12 : Résultats obtenus avec les composés actifs dans les conditions A

Intensifiant	Concentration optima (micromole)	Maximum d'absorption (nm)	Intensité
Néant			0,05
Naphtol-1	50	520	0,18
Naphtorésorcinol	5	540	0,38
Orcinol	100	520	0,19
Phénylhydrazine	1	520	0,14
Résorcinol	500	520	0,83
Thiosemicarbazide	4	520	0,19
Urée	500	500	0,10

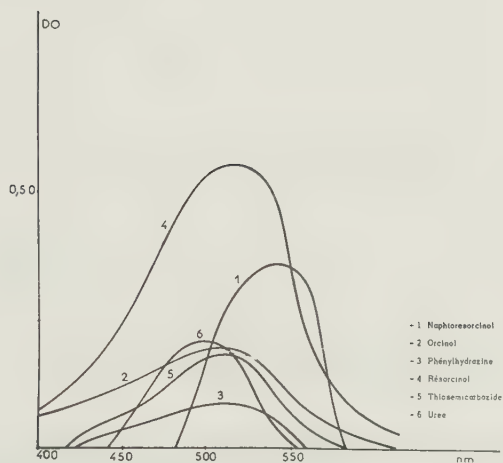
Nous avons représenté sur le graphique 5 les spectres d'absorption obtenus avec les différents intensifiants : avec la phénylhydrazine, le thiosemicarbazide, l'orcinol et le résorcinol, les colorations ont toutes un même maximum d'absorption à 520 nm.

2 - Réactions parasites

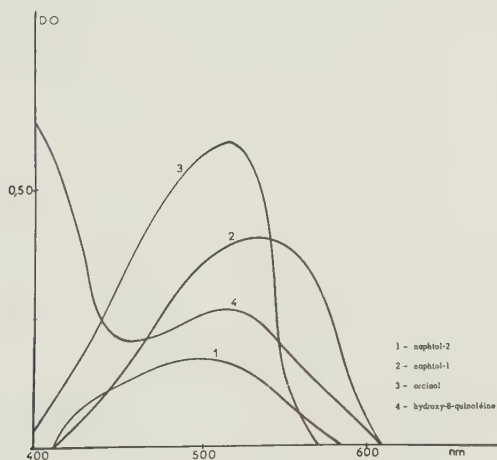
Certains intensifiants réagissent soit avec le dioxo-2,3 butane, soit avec NaOH et provoquent des interférences.

- Réaction avec le dioxo-2,3 butane

. Urée : coloration jaune maxima à 480 nm



Graphique 5 Réaction créatine-dioxo-2,3 butane : Spectre d'absorption des colorations (conditions A).



Graphique 6 Réaction créatine-dioxo-2,3 butane : Spectre d'absorption des colorations (conditions B).

- . Thiourée : coloration jaune
- . Phénylhydrazine : coloration jaune

- Réaction avec l'alcalin

- . Résorcinol : coloration jaune vert maxima à 460 nm
- . Orcinol : coloration rose maxima à 480 nm
- . Naphtorésorcinol : coloration brun-rose maxima à 510 nm

Toutes les colorations parasites absorbent encore à 520 nm et s'intensifient avec le temps, comme le montre le tableau 13.

Tableau 13 : Interférence à 520 nm des colorations parasites

Intensifiant	Témoin réactif Lecture après:			Témoin réactif sans dioxo-2,3 butane Lecture après 5 mn
	5 mn	60 mn	120 mn	
Néant	0,05	0,10	0,11	0
Naphtol-1	0,10	0,14	0,16	0,06
Phénylhydrazine	0,07	0,09	0,09	0
Résorcinol	0,07	0,25	0,29	0,14
Orcinol	0,10	0,18	0,23	0,19
Naphtorésorcinol	0,22	0,33	0,39	0,42
Urée	0,20	0,47	0,70	0
Thiosemicarbazide	0,05	0,12	0,15	0

b - INTENSIFIANTS EN MILIEU ALCALIN 0,25 N (CONDITIONS B)

Peu de composés modifient la réaction colorée dans ces conditions opératoires.

1 - Action sur la réaction créatine-dioxy-2,3 butane

Le tableau 14 groupe les résultats obtenus :

Tableau 14 : Résultats obtenus avec les composés actifs dans les conditions B

Intensifiants	Concentration optima (micromoles)	Maximum d'absorption (nm)	Intensité	
			Dosage	Témoin Réactif
Néant		520	0,05	0,04
Naphtol - 1	200	530	0,32	0,15
Naphtol - 2	400	500	0,26	0,19
Orcinol	50	520	0,99	0,16
Hydroxy-8-quinoléine	200	520	0,18	0,11
Résorcinol	5	520	0,27	0,10

Le graphique 6 représente les spectres d'absorption obtenus. Les colorations en présence d'orcinol et d'hydroxy-8-quinoléine présentent un même maximum d'absorption (520 nm). Celles de l'alpha- et du bêta-naphtol sont maxima respectivement à 530 et 500 nm. Il faut encore noter que toutes ces colorations manquent de stabilité.

2 - Réactions parasites

Des colorations parasites dues à la réaction propre de l'adjuvant avec le dioxo-2,3 butane ou la soude, interfèrent nettement comme le montre le tableau précédent. De plus, avec l'orcinol et le résorcinol, elles s'intensifient très rapidement avec le temps.

CONCLUSIONS

Dans le milieu le plus alcalin, les meilleurs intensifiants sont le résorcinol et le naphtorésorcinol. Mais l'alcalinité élevée de ce milieu, défavorable à la spécificité, réduit leur utilisation pratique.

Dans les conditions B, en milieu moins alcalin, l'orcinol est nettement supérieur à l'alpha-naphtol. C'est pourquoi une étude approfondie de la réaction développée en présence d'orcinol s'imposait.

CONCLUSIONS SUR LES ESSAIS D'AMELIORATION DE LA REACTION

CREATINE - DIOXO-2,3 BUTANE

Contrairement aux résultats obtenus en milieu acide, peu de composés se sont révélés actifs sur la réaction créatine-dioxo-2,3 butane.

- La plupart des solvants inhibent le développement des colorations.

- Les sels métalliques précipitent ou sont inactifs.

- Parmi les substances à caractère oxydant ou réducteur, nous avons mis en évidence le pouvoir inhibiteur du ferricyanure de potassium, de la chloramine, de l'acide ascorbique, du sulfite de sodium.

- Nous avons montré que parmi les dérivés intensifiants, le résorcinol, le naphtrésorcinol et l'orcinol amélioreraient nettement la réaction créatine - dioxo-2,3 butane mais que seul l'orcinol pouvait conduire à une application pratique.

CHAPITRE III

INTERET DE L'ADDITION D'ORCINOL ET DE GLUCURONOLACTONE

A LA REACTION CREATINE-DIOXO-2,3 BUTANE

Les essais précédents ont montré que le remplacement de l'alpha-naphtol par l'orcinol conduisait en milieu peu alcalin, à une réaction trois fois plus sensible ; cependant l'intérêt de cette amélioration est limité par le développement rapide d'une réaction parasite.

Il nous fallait donc supprimer la réaction secondaire. L'addition d'alcool fut sans effet, bien au contraire.

Nous avons alors pensé introduire dans le milieu réactionnel un composé stabilisant la réaction. Dans les essais préliminaires sur l'action des substances intensifiantes, nous avons noté le très net pouvoir stabilisant de la lactone de l'acide glucuronique (glucuronolactone), déjà signalé pour la réaction dicétone - dérivés carbamidés (1).

Nous avons vérifié l'effet de ce composé sur la réaction créatine - dioxo-2,3 butane - orcinol. En présence de glucuronolactone l'intensification apportée par l'orcinol est un peu plus faible mais elle reste encore supérieure à celle produite par l'alpha-naphtol et surtout la réaction secondaire est inhibée.

Ces essais nous ont encouragée à reprendre l'étude des conditions optima de la réaction pour obtenir une coloration intense avec un témoin réactif peu coloré. Les résultats obtenus nous ont également conduit à vérifier l'action de la glucuronolactone sur la coloration développée en présence d'alpha-naphtol ainsi que la réactivité d'un homologue supérieur de la glucuronolactone : la lactone de l'acide glucoheptonique. Notons dès à présent que ce dernier composé ne possède pas le pouvoir stabilisant de la glucuronolactone et que son usage n'apporterait aucune amélioration.

Nos essais ont été réalisés en l'absence et avec trois concentrations de glucuronolactone (10 - 25 et 50 micromoles).

Nous avons repris les différents paramètres précédemment étudiés :

- spectre

- alcalinité
- concentration en dioxo-2,3 butane
- taux optima d'orcinol
- cinétique - stabilité

1 - Spectre

L'addition de glucuronolactone ne modifie pas le spectre d'absorption de la coloration qui reste identique à celui obtenu avec l'orcinol (maxima à 520 nm).

2 - Alcalinité

Les variations de la coloration en fonction de l'alcalinité sont représentées dans le graphique 7. On constate qu'en l'absence ou avec 10 micromoles de glucuronolactone, l'alcalinité optima est de 0,75 millimoles de NaOH.

Avec 25 ou 50 micromoles, les conditions optima sont moins critiques (0,75 à 3 millimoles de NaOH), mais l'intensité de la coloration est plus faible. Nous avons adopté une concentration moyenne : 1,5 millimoles.

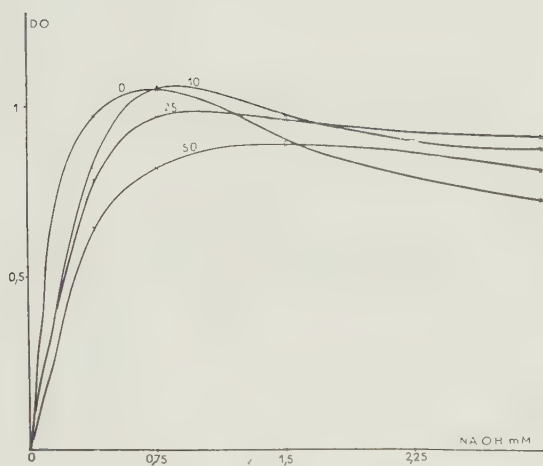
3 - Dioxo-2,3 butane

Nous avons étudié les variations de l'intensité des colorations en fonction du taux de dioxo-2,3 butane en l'absence et en présence de 25 micromoles de glucuronolactone (graphique 8).

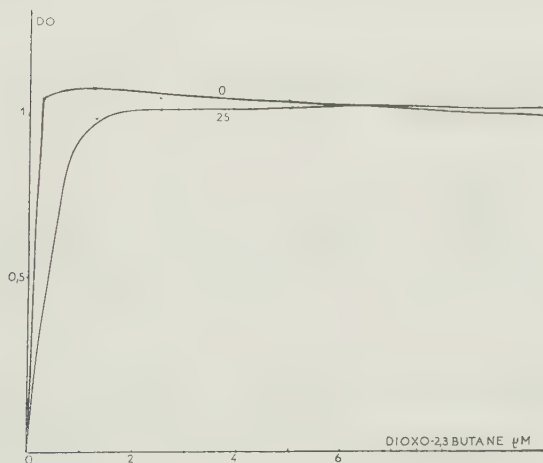
Dans les deux cas, l'intensité de la réaction ne varie pas pour des concentrations de dioxo-2,3 butane allant de 2 à 10 micromoles.

Des résultats similaires ont été obtenus en présence de 10 et 50 micromoles de glucuronolactone qui modifient seulement l'intensité du complexe coloré.

On constate également (tableau 15) que la réaction parasite est inhibée par l'addition de glucuronolactone au milieu réactionnel, même pour de fortes concentrations en dioxo-2,3 butane.



Graphique 7 Influence de l'alcalinité sur la réaction créatine-dioxo-2,3, butane-orsinol, avec différentes concentrations de glucuronolactone.



Graphique 8 Réaction créatine-dioxo-2,3 butane-orsinol, Influence de la concentration en dioxo-2,3 butane en présence et en l'absence de glucuronolactone.

Tableau 15 : Intensité des témoins réactifs en fonction de la concentration en dioxo-2,3 butane

Dioxo-2,3 butane micromoles	0,5	1,25	2,5	5	10
sans glucuronolactone	0,10	0,10	0,15	0,17	0,28
glucuronolactone (25 micromoles)	0,04	0,05	0,05	0,06	0,09

4 - Orcinol

L'addition de glucuronolactone dans le milieu réactionnel ne modifie pas la concentration optima en orcinol qui reste de 50 micromoles quelle que soit la quantité de dérivé stabilisant introduite (graphique 9).

Comme précédemment, seule l'intensité de la réaction baisse avec l'augmentation en glucuronolactone.

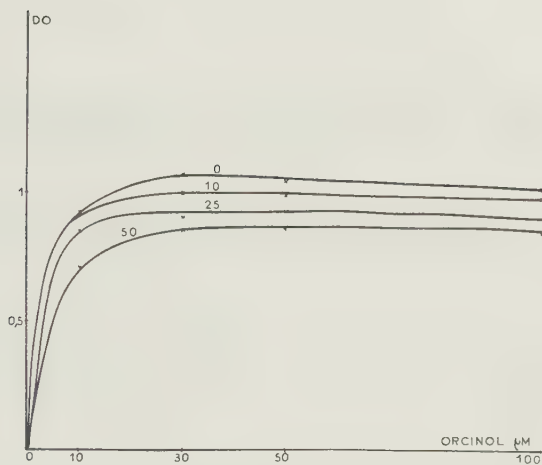
5 - Cinétique - Stabilité

Sauf à 0°, la réaction se développe rapidement (graphique 10) l'intensité est maxima après 10 minutes de chauffage. A 20° ou à 37°, la coloration reste stable même si le temps de bain-marie est prolongé à 30 minutes.

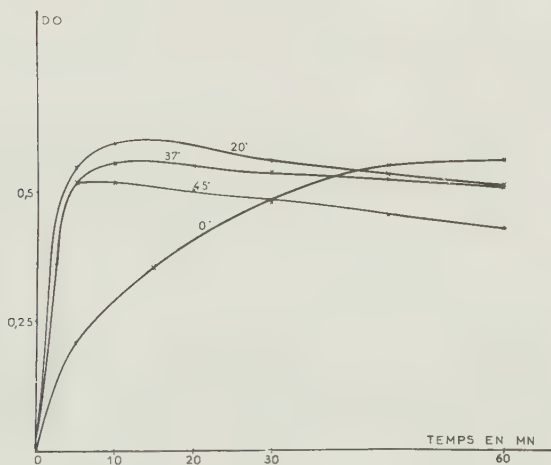
A 45°, l'intensité légèrement inférieure du complexe coloré baisse plus rapidement si l'on augmente la durée du chauffage.

Une température basse (0°), retarde le développement de la coloration qui n'atteint son maximum qu'après 45 à 60 minutes.

La cinétique et l'intensité de la réaction sont, aux erreurs expérimentales près, identiques à 20 et 37° : nous préférons développer les colorations à 37° parce que, en pratique, cette température est plus facilement régulée avec les bains-marie de laboratoire.



Graphique 9 Réaction créatine-dioxo-2,3 butane-orcinol. Variations de l'intensité des colorations en fonction du taux d'orcinol et de la concentration en glucuronolactone.



Graphique 10 Cinétique de la réaction créatine-dioxo-2,3 butane-orcinol.

L'étude de la stabilité de la réaction, après 10 minutes de chauffage à 37°, a été réalisée avec les concentrations de glucuronolactone testées dans les essais précédents (tableau 16).

Tableau 16 : Etude de la stabilité de la réaction colorée et des témoins réactifs (créatine 200 nM).

Glucurono lactone (micromoles)	0		10		25		50	
Lecture après	Témoin	Dosage	Témoin	Dosage	Témoin	Dosage	Témoin	Dosage
10 minutes	0,12	1,04	0,08	0,99	0,05	0,95	0,045	0,88
30 minutes	0,14	1,02	0,08	0,97	0,06	0,97	0,05	1,05
60 minutes	0,16	1,01	0,10	0,95	0,08	0,96	0,05	1
3 heures	0,20	0,90	0,12	0,88	0,10	0,96	0,05	0,95
6 heures	0,29	0,81	0,20	0,85	0,13	0,80	0,10	0,86

L'introduction de 25 micromoles de composé apporte la meilleure stabilité : la coloration au départ légèrement inférieure à celle du témoin sans glucuronolactone, reste pratiquement stable pendant 3 heures. Avec une concentration plus forte, la réaction n'est pas entièrement développée et elle s'intensifie encore après le chauffage.

Nous avons également suivi l'évolution de la réaction parasite (tableau 16) : il faut introduire au minimum 25 micromoles de glucuronolactone pour inhiber le développement de la réaction secondaire: avec de plus faibles concentrations, le témoin réactif brunit plus rapidement.

EFFET DE LA GLUCURONOLACTONE SUR LA REACTION DEVELOPPEE EN PRESENCE D'ALPHA-NAPHTOL

L'étude des conditions de la réaction montre que, comme pour l'orcinol, la glucuronolactone ne modifie pas les concentrations optima en réactif, mais influe sur la stabilité et la cinétique de la coloration : avec une concentration supérieure à 10 micromoles, la coloration se développe encore après le chauffage.

D'autre part, le pouvoir inhibiteur de la glucuronolactone est marqué (tableau 17) et cette inhibition limite son intérêt.

Tableau 17 : Intensité de la réaction créatine dioxo-2,3 butane -
alpha-naphtol en présence d glucuronolactone
(créatine 200 n M)

Glucurono lactone (micromoles)	0		10		25		50	
Lecture après	Témoin	Dosage	Témoin	Dosage	Témoin	Dosage	Témoin	Dosage
15 minutes	0,18	0,69	0,11	0,66	0,09	0,60	0,10	0,47
30 minutes	0,20	0,68	0,13	0,67	0,10	0,65	0,11	0,55
60 minutes	0,25	0,62	0,14	0,68	0,10	0,68	0,11	0,67
120 minutes	0,30	0,55	0,14	0,67	0,11	0,69	0,12	0,68

CONCLUSIONS

Nous avons montré que la lactone de l'acide glucuronique agissait sur l'intensité et la stabilité de la coloration sans beaucoup modifier les concentrations optima des différents réactifs : les conditions de la réaction sont moins critiques et restent identiques quel que soit le taux de composé stabilisant introduit.

La coloration brune parasite de l'orcinol en milieu alcalin est inhibée et la réaction stabilisée pendant plus de 60 minutes.

Mais à forte concentration, la glucuronolactone inhibe également la coloration rouge de la créatine. Nous avons donc choisi une concentration conduisant à une réaction stable avec une inhibition limitée (25 micromoles).

Les conditions opératoires retenues pour un volume réactionnel de 6 ml sont les suivantes :

- dioxo-2,3 butane	5	micromoles
- orcinol	50	micromoles
- glucuronolactone	25	micromoles
NaOH	1,5	millimoles

Temps de développement de la coloration : 10 minutes à 37°. Lecture à 520 nm après 10 minutes de refroidissement.

L'orcinol et la glucuronolactone peuvent être réunis dans un seul réactif, stable au moins six mois au frigidaire et à l'abri de la lumière.

L'addition de glucuronolactone permet donc d'utiliser le net pouvoir intensifiant de l'orcinol et ainsi de doubler la sensibilité de la réaction créatine - dioxo-2,3 butane.

CHAPITRE IV

REACTION CREATINE - DIOXO-2,3, PHENYL-3 PROPANE

Nous avons mentionné dans l'historique des réactions colorées des composés guanidiques avec les dicétones, l'utilisation en 1929 (10) d'une seconde alpha-dicétone : le dioxo-2,3, phényl-3 propane (phényl-propanedione) en remplacement du dioxo-2,3 butane.

Cette dicétone réagit en milieu alcalin avec la créatine en donnant une coloration violette présentant un maximum d'absorption à 570 nm. LANG (30) a mis en évidence ses avantages : non volatilité, absence de réaction parasite. Le dioxo-2,3, phényl-3 propane a été utilisé par DICKENMANN et coll. (47) pour doser les dérivés carbamidés en milieu acide. Mais à notre connaissance, la réaction en milieu alcalin n'a pas été reprise depuis les travaux de LANG (30) si ce n'est comme procédé de révélation en chromatographie (27, 31).

L'argumentation de LANG et le nombre réduit de techniques nous ont incitée à vérifier la réactivité de cette alpha-dicétone : nous avons, comme avec le dioxo-2,3 butane, défini les conditions optimales de la réaction puis nous avons tenté d'améliorer sa sensibilité.

1 - REACTION CREATINE - DIOXO-2,3, PHENYL-3 PROPANE

Nous avons déterminé les concentrations de réactif les plus favorables puis nous avons étudié la cinétique et la stabilité de la réaction.

Les conditions opératoires de base sont celles définies pour le dioxo-2,3 butane : la réaction est développée au bain-marie à 37° en présence d'alpha-naphtol pendant 15 minutes dans un volume final de 6 ml ; la prise d'essai est de 200 nanomoles de créatine. L'intensité de la coloration est lue à 570 nm, après 10 minutes de refroidissement.

A - Dioxo-2,3, phényl-3 propane

Cette dicétone se présente sous forme d'un liquide jaune, huileux, peu soluble dans l'eau. Elle a été utilisée en solution dans

l'éthanol (27, 30) ou dans H_3PO_4 dilué (47).

Etant donné le rôle inhibiteur des alcools sur la réaction créatine - dioxo-2,3 butane, nous préférons employer une solution aqueuse de dicétone : la limite de solubilité (solution 0,01 M) est compatible avec la quantité de réactif à introduire dans le milieu réactionnel. Mais cette solution, conservée à l'abri de la lumière vive, doit être renouvelée tous les jours.

Les variations de l'intensité de la coloration en fonction de la concentration en dioxo-2,3, phényl-3 propane (tableau 18) sont importantes et contrairement au dioxo-2,3 butane, la concentration optima 2,5 micromoles, est assez critique.

Il faut encore noter que le témoin réactif est presque aussi coloré qu'avec la première dicétone essayée.

Tableau 18 : Intensité des colorations en fonction de la concentration en dioxo-2,3, phényl-3 propane (créatine 200 n M)

Dioxo-2,3, phényl-3 propane (micromoles)	0,5	1,25	2,5	5	7,5	10	12,5	15
D.O. Dosage	0,21	0,29	0,36	0,32	0,27	0,23	0,20	0,18
D.O. Témoin réactif	0,08	0,09	0,11	0,15	0,18	0,20	0,23	0,25

B - Alcalinité

En présence de dioxo-2,3, phényl-3 propane, seules NaOH ou KOH permettent le développement d'une coloration qui est plus intense avec NaOH.

Les variations de la coloration en fonction de l'alcalinité (tableau 19) sont comparables à celles obtenues avec la première dicétone : la coloration est inhibée par un excès d'alcalin, les conditions

optima ne sont pas critiques : l'intensité est maxima pour 0,75 à 1,5 millimoles de NaOH.

Ici encore nous proposons donc l'utilisation de 1,5 millimoles de NaOH.

Tableau 19 : Influence de l'alcalinité sur la réaction créatine - dioxo-2,3, phényl-3 propane. (créatine 200 n M)

Alcalin (millimoles)	0,15	0,37	0,75	1,12	1,5	2,25
NaOH	0,26	0,32	0,34	0,35	0,35	0,32
KOH	0,18	0,22	0,28	0,29	0,32	0,31

C - Alpha-naphtol

Le pouvoir intensifiant de l'alpha-naphtol n'avait pas encore été démontré quand ont été publiés les travaux de DULIERE (10) et LANG (30). Son action n'a donc jamais été vérifiée sur la réaction du dioxo-2,3, phényl-3 propane.

En l'absence d'alpha-naphtol, la réaction est peu sensible : on ne peut déceler moins de 100 microgrammes de créatine ; la coloration ne se développe qu'en milieu fortement alcalin (20 millimoles).

Comme pour le dioxo-2,3 butane, l'introduction d'alpha-naphtol sensibilise 10 fois la réaction.

Les variations de l'intensité en fonction de sa concentration sont de même ordre qu'avec le dioxo-2,3 butane et la concentration optima est identique : 40 mg (tableau 20).

Tableau 20 : Intensité des colorations en fonction de la concentration en alpha-naphtol (créatine 200 n M)

Alpha-naphtol (mg)	0	20	40	60	80	100
Dosage	0,01	0,38	0,40	0,39	0,37	0,39
Témoin réactif	0,02	0,07	0,09	0,09	0,12	0,13

D - Cinétique - Stabilité

Sans alpha-naphtol, les conditions optima de température et de durée de chauffage ne pouvaient être déterminées (graphique 11), les colorations évoluant toujours quelles que soient les conditions opératoires.

Par contre en présence de dioxo-2,3, phényl-3 propane et d'alpha-naphtol, la cinétique de la réaction est mieux définie (graphique 12). La coloration se développe lentement, le chauffage à 37° ou à 45° est nécessaire pour accélérer le développement du complexe coloré. Cette évolution plus lente avait déjà été remarquée dans la réaction alpha-dicétone - dérivés carbamidés (1). La réaction est pratiquement aussi intense à 37° et à 45°. Nous préférons opérer à 37° car à cette température, le témoin réactif est moins coloré.

La concentration en dioxo-2,3, phényl-3 propane, ou l'alcalinité ne modifient que l'intensité et non la cinétique de la réaction.

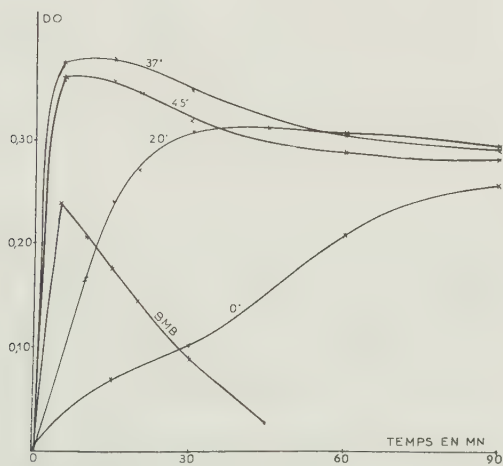
La stabilité de la coloration est identique à celle donnée par le dioxo-2,3 butane : à 37° ou à 45°, les colorations baissent de 8 à 10 % en 60 minutes.

CONCLUSIONS

Les conditions optima de la réaction créatine - dioxo-2,3, phényl-3 propane sont voisines de celles du dioxo-2,3 butane.



Graphique 11 Cinétique de la réaction créatine-dioxo-2,3, phényl-3 propane en l'absence d'alpha-naphtol.



Graphique 12 Réaction créatine-dioxo-2,3, phényl-3 propane. Cinétique de la réaction à différentes températures.

- dioxo-2,3, phényl-3 propane 2,5 micromoles
- alpha-naphtol 40 mg
- NaOH 1,5 millimoles
- temps de développement de la coloration 10 minutes à 37°. Lecture à 570 nm après 10 minutes.

Cependant, la réaction donnée par le dioxo-2,3, phényl-3 propane est deux fois moins sensible que celle du dioxo-2,3 butane.

2 - ACTION DES COMPOSES MODIFIANT LA REACTION CREATINE - DIOXO-2,3, PHENYL-3 PROPANE

Nous avons contrôlé l'action des quatre groupes de composés testés avec le dioxo-2,3 butane :

- solvants
- sels métalliques
- composés à caractère oxydant ou réducteur
- substances intensifiant les réactions colorées

A - Solvants organiques

Le pouvoir inhibiteur des alcools et des solvants sur la réaction créatine - dioxo-2,3 butane, se retrouve avec le dioxo-2,3, phényl-3 propane (tableau 21) .

Parmi les alcools, le méthanol et l'éthylène glycol inhibent fortement la coloration. L'éthanol et le propanol sont moins actifs.

Le pouvoir inhibiteur des solvants croît en passant du méthylal, à l'acétone puis à l'éthylméthylcétone et au dioxane. Il faut remarquer que le dioxane et l'acétone inhibent fortement la réaction du dioxo-2,3, phényl-3 propane alors qu'ils étaient peu actifs avec la première dicétone.

De plus, ici encore, l'acétone présente par elle-même une coloration qui intensifie le témoin réactif.

Tableau 21 : Intensité des colorations en présence de solvant
(créatine 200 n M)

Solvants (mL)	0	0,5	1
Méthanol	0,37	0,19	0,13
Ethanol	0,37	0,30	0,27
Propanol	0,37	0,33	0,26
Ethylène-glycol	0,37	0,17	0,08
Acétone	0,37	0,28	0,18
Ethylméthylcétone	0,37	0,18	0,11
Dioxane	0,37	0,13	0,02
Méthylal	0,37	0,38	0,37

B - Sels métalliques

Les essais d'activité des cations ont été réalisés avec les composés testés dans le premier cas.

Comme avec le dioxo-2,3 butane, on note :

- la précipitation des hydroxydes
- le pouvoir inhibiteur marqué du nitrate de cobalt
- le développement d'une coloration parasite avec les sels de cobalt, cuivre et argent. En présence de dioxo-2,3 butane, nous n'avons pas observé de réaction avec ce dernier cation.

C - Composés à caractère oxydant ou réducteur

Les résultats obtenus avec les oxydants (tableau 22) sont comparables à ceux notés avec le dioxo-2,3 butane.

Tableau 22 : Intensité des colorations en présence d'oxydants.
(créatine 200 nM)

Oxydants (micromoles)	0	0,5	5	50
Acide arsénique	0,37	0,37	0,37	0,37
Arséniate de sodium	0,37	0,37	0,38	0,36
Chloramine T	0,37	0,37	0,34	0,26
Chlorate de sodium	0,37	0,36	0,38	0,38
Ferricyanure de potassium	0,37	0,37	0,32	précipitation
Nitrate de sodium	0,37	0,38	0,38	0,38

On retrouve une action inhibitrice avec la chloramine et le ferricyanure de potassium qui donnent par eux-mêmes une coloration parasite.

Nous avons comparé le pouvoir inhibiteur des réducteurs (tableau 23) sur des réactions développées avec les deux dicétones.

- Quelle que soit la dicétone utilisée, l'acide ascorbique est le dérivé le plus actif,

- Le nitrate de sodium n'inhibe aucune des deux colorations.

- Le pouvoir inhibiteur du sulfate d'hydrazine, introduit dans le milieu à raison de 0,5, 2,5 et 25 micromoles (insolubilité à plus forte concentration) est plus marqué avec le dioxo-2,3, phényl-3 propane ; l'inhibition est de 100 % alors qu'elle n'était que de 62 % dans le premier cas ; par contre le sulfite de sodium est moins inhibiteur (40 % au lieu de 62 %).

Tableau 23 : Intensité de la réaction en présence de composés réducteurs (créatine 200 n M)

Composés réducteurs (micromoles)	0	0,5	5	50
Acide ascorbique	0,37	0,39	0,01	0,02
Hydroquinone	0,37	0,36	coloration brune	coloration brune
Chlorhydrate d'hydroxylamine	0,37	coloration violet	coloration verte	coloration verte
Nitrite de sodium	0,37	0,42	0,41	0,41
Sulfite de sodium	0,37	0,36	0,37	0,22

L'hydroquinone et le chlorhydrate d'hydroxylamine développent des colorations parasites importantes.

Les réactions évoluent également après le chauffage. Comme généralement, plus l'inhibition est marquée, plus les colorations s'intensifient après le bain-marie.

B - Intensifiants

L'étude des intensifiants n'a porté que sur les dérivés

actifs avec la première dicétone.

Nous avons testé les composés dans les deux conditions opératoires suivantes :

	Conditions C	Conditions D
Créatine (micromoles)	2	0,2
Dioxo-2,3, phényl-3 propane (micromoles)	7,5	2,5
Alcalinité finale	NaOH 3,3 N	NaOH 0,25 N

Ces conditions sont légèrement différentes de celles employées avec le dioxo-2,3 butane : elles correspondent aux conditions optima définies pour le dioxo-2,3, phényl-3 propane.

1 - Intensifiants en milieu alcalin 3,3 N
(conditions C)

Dans ce milieu, les composés les plus actifs sont, par ordre d'activité croissante : l'urée, l'orcinol, le résorcinol et l'alpha-naphtol. Mais il se développe également des réactions parasites.

Le tableau 24 indique les concentrations optima, l'intensité des réactions ainsi que celles des témoins, le maximum d'absorption des colorations.

Les résultats diffèrent légèrement de ceux obtenus avec le dioxo-2,3 butane :

- le composé le plus actifs est l'alpha-naphtol

- les concentrations optima sont plus importantes pour l'alpha-naphtol et plus faibles pour le résorcinol et l'urée

Tableau 24 : Résultats obtenus avec les composés actifs dans les conditions C.

Intensifiant	Concentration optima (micromoles)	Maximum d'absorption (nm)	Intensité	
			Dosage	Témoin
Néant		570	0,33	0,03
Naphtol-1	500	570	1,49	0,07
Orcinol	100	540	1,03	0,07
Résorcinol	300	550	1,20	0,07
Urée	200	570	0,47	0,03

- l'orcinol et le résorcinol modifient le spectre des colorations (maximum à 540 et 550 nm)

- la phénylhydrazine, le naphtorésorcinol, la thiourée et le thiosemicarbazide inhibent ou sont sans action sur la coloration.

Comme avec la première dicétone, la forte alcalinité du milieu, le développement de réactions secondaires limitent l'intérêt du pouvoir intensifiant de l'alpha-naphtol, de l'orcinol et du résorcinol.

2 - Intensifiants en milieu alcalin 0,25 N (conditions D)

Dans ce milieu, les composés les plus réactifs sont par ordre d'activité croissante : le bêta-naphtol, l'hydroxy-8-quinoléine, l'alpha-naphtol, le résorcinol et l'orcinol.

L'examen du tableau 25 résumant ces essais indique que :

- l'orcinol et le résorcinol sont les composés les plus actifs

- les réactions parasites dues à la réaction de l'intensifiant et de la dicétone ou de l'alcalin, sont intenses avec le ré-sorcinol et à un degré moindre avec l'orcinol et l'alpha-naphtol. Ces réactions secondaires amènent un brunissement rapide des colorations.

- l'orcinol, le ré-sorcinol et le bêta-naphtol déplacent le maximum d'absorption des colorations. Cet effet est plus net qu'avec le dioxo-2,3 butane.

Tableau 25 : Résultats obtenus avec les composés actifs dans les conditions D

Intensifiant	Concentration optima (micromoles)	Maximum d'absorption (nm)	Intensité	
			Dosage	Témoin
Néant		570	0,01	0,04
Hydroxy-8-quinoléine	100	570	0,14	0,05
Naphtol-1	200	570	0,23	0,13
Naphtol-2	200	555	0,08	0,12
Orcinol	50	540	0,66	0,21
Résorcinol	200	540	0,41	0,45

CONCLUSIONS

Les composés modifiant la réaction créatine - dioxo-2,3 phényl-3 propane sont généralement ceux déjà actifs sur la coloration créatine - dioxo-2,3 butane.

Avec le dioxo-2,3, phényl-3 propane, nous avons retrouvé :

- l'inhibition par les alcools et les solvants

- la faible influence des cations
- le pouvoir inhibiteur des composés à caractère oxydant et celui plus marqué des réducteurs
- l'intensification de la coloration en présence de phénols et plus particulièrement d'orcinol. Mais nous avons constaté quelques modifications dans le pouvoir intensifiant de l'alpha-naphtol et du résorcinol : l'alpha-naphtol est plus actif sur la réaction du dioxo-2,3 phényl-3 propane quelles que soient les conditions d'alcalinité. Par contre le pouvoir intensifiant du résorcinol est plus faible dans les conditions C alors qu'il est plus important dans les conditions D.

En pratique, seul le pouvoir intensifiant de l'orcinol en milieu faiblement alcalin est susceptible d'application. Mais l'intérêt de ce composé est limité par le développement rapide d'une réaction parasite.

Nous avons tenté de palier aussi à cet inconvénient en introduisant dans le milieu réactionnel, la lactone de l'acide glucuronique dont nous avons précédemment montré l'intérêt (chapitre III).

3 - REACTION CREATINE - DIOXO-2,3, PHENYL-3 PROPANE EN PRESENCE D'ORCINOL ET DE GLUCURONOLACTONE

Des essais préliminaires nous ont montré que la glucuronolactone stabilisait la coloration en empêchant le développement de la réaction parasite ; nous avons également constaté une légère inhibition de l'intensité du complexe coloré.

La concentration optima reste de 25 micromoles. Nous avons vérifié qu'à ce taux, la lactone de l'acide glucuronique ne modifiait ni le spectre de la coloration (maximum 540 nm), ni les concentrations optima des autres réactifs qui restent les suivantes :

- dioxo-2,3, phényl-3 propane..... 2,5 micromoles
- orcinol..... 50 micromoles
- NaOH..... 1,5 millimoles

Dans ces conditions, la réaction reste stable pendant au moins 45 minutes (tableau 26) sans qu'il se produise de brunissement des colorations.

Tableau 26 : Intensité des colorations en présence d'orcinol et de glucuronolactone (créatine 200 nM)

	Orcinol 50 micromoles		Orcinol 50 micromoles + glucuronolactone 25 micromoles	
	Témoin	Dosage	Témoin	Dosage
Lecture après 15 mn	0,25	0,69	0,07	0,60
45 mn	0,33	0,66	0,05	0,60
2 h	0,49	0,51	0,08	0,50
3 h 30	0,90	0,17	0,09	0,37

CONCLUSIONS

Nous avons amélioré la sensibilité de la réaction colorée en remplaçant l'alpha-naphtol par l'orcinol et la glucuronolactone.

Les conditions opératoires, pour un volume final de 6 ml se définissent ainsi :

- dioxo-2,3 phényl-3 propane	2,5 micromoles
- orcinol	50 micromoles
- glucuronolactone	25 micromoles
- NaOH	1,5 millimoles

- Temps de développement de la coloration 10 minutes à 37°. Lecture à 540 nm après 15 minutes.

Malgré le pouvoir intensifiant de l'orcinol, la réaction du dioxo-2,3 phényl-3 propane reste moins sensible que celle du dioxo-2,3 butane.

CONCLUSIONS SUR L'ETUDE DU DIOXO-2,3, PHENYL-3 PROPANE

Il existe une grande analogie entre cette dicétone et le dioxo-2,3 butane. Ces deux composés réagissent avec la créatine dans un milieu de même alcalinité, avec des concentrations identiques d'alpha-naphtol. Les deux réactions sont inhibées par les alcools, les solvants, les oxydants, les réducteurs ; elles sont peu modifiées par les sels métalliques. Le meilleur intensifiant des réactions est l'orcinol.

Cependant nous avons pu mettre en évidence des caractères particuliers au dioxo-2,3, phényl-3 propane :

- la réaction demande une plus faible concentration de dicétone ; elle présente une cinétique plus lente

- la coloration est plus sensible au pouvoir inhibiteur de l'acétone et du dioxane

- l'alpha-naphtol et le résorcinol intensifient différemment les colorations développées en présence de dioxo-2,3 butane ou de dioxo-2,3, phényl-3 propane

- en présence de dioxo-2,3, phényl-3 propane, la stabilité de la réaction est de brève durée.

Dans les meilleures conditions, que ce soit en présence d'alpha-naphtol ou d'orcinol, la réaction reste moins sensible. De plus la faible solubilité de la dicétone en milieu aqueux et l'instabilité de la solution utilisée représentent un inconvénient certain qui limite les applications de cette réaction.

C H A P I T R E V

NOUVELLE REACTION COLOREE CREATINE - DIOXO-2,3 PENTANE

L'étude comparative des alpha-dicétones (chapitre VI) nous a conduit à vérifier l'activité des homologues du dioxo-2,3 butane. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une réaction colorée originale avec le dioxo-2,3 pentane.

Cette dicétone réagit en effet en milieu alcalin avec la créatine en donnant une coloration rouge. Nous avons recherché les conditions les plus favorables au développement de la coloration en nous basant sur les résultats obtenus avec le dioxo-2,3 butane.

La réaction est développée au bain-marie à 37° en présence d'alpha-naphtol ou d'orcinol, dans un volume final de 6 ml. La prise d'essai est de 200 nanomoles de créatine. Les colorations sont lues au maximum d'absorption : 530 nm avec l'alpha-naphtol, 520 nm avec l'orcinol.

1 - REACTION CREATINE-DIOXO-2,3 PENTANE - ALPHA-NAPHTOL

a - Dioxo-2,3 pentane

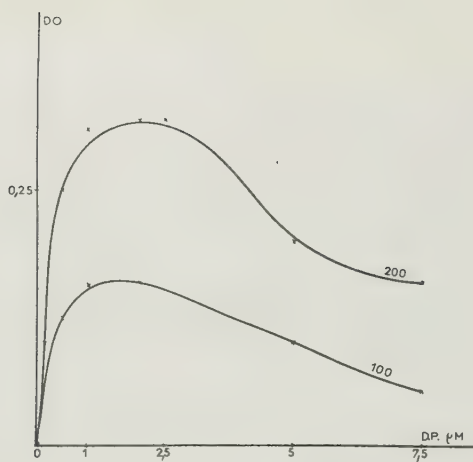
Cette alpha-dicétone se présente sous forme d'un liquide jaune. Elle est soluble dans l'eau. La solution doit être conservée à l'abri de la lumière ; sa stabilité n'excède pas 24 heures en solution 0,1 M.

L'étude des variations de l'intensité de la coloration en fonction de la concentration en dicétone (graphique 13) montre que le complexe coloré se forme déjà avec une faible quantité de dicétone et qu'un excès est fortement inhibiteur.

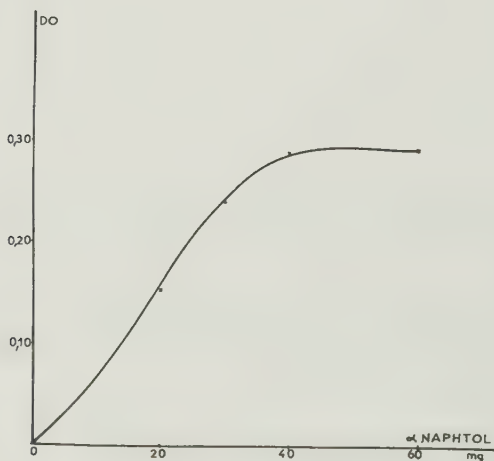
La réaction la plus intense est obtenue avec 1,5 à 2,5 micromoles de dioxo-2,3 pentane. Nous avons choisi une concentration moyenne : 2 micromoles.

b - Alcalinité

La réaction est peu sensible aux variations de l'alcalinité



Graphique 13 Réaction créatine-dioxo-2,3 pentane-alpha-naphtol : Variations de l'intensité en fonction de la concentration en dicétone pour 100 et 200 nanomoles de créatine.



Graphique 14 Variations de l'intensité de la réaction créatine-dioxo-2,3 pentane, alpha-naphtol en fonction du taux d'alpha-naphtol.

l'intensité est maxima pour 1 à 2,5 millimoles de NaOH. Des résultats similaires sont obtenus si l'on remplace NaOH par KOH aux mêmes concentrations. Nous avons adopté la même alcalinité que dans les réactions précédentes : 1,5 millimoles.

c - Alpha-naphtol

La concentration la plus favorable est de 40 mg (graphique 14). Un taux supérieur entraîne une augmentation de la coloration parasite sans intensifier la réaction colorée.

d - Cinétique - Stabilité

Nous avons suivi le développement de la réaction à 20° et 37° (graphique 15).

A 20°, la coloration se développe lentement et n'a pas atteint son maximum après 30 minutes. A 37° au contraire, le complexe coloré est entièrement formé après 10 minutes de chauffage.

Notre choix s'est donc arrêté à une température de 37°, d'autant plus que la stabilité de la réaction est meilleure à cette température (graphique 16).

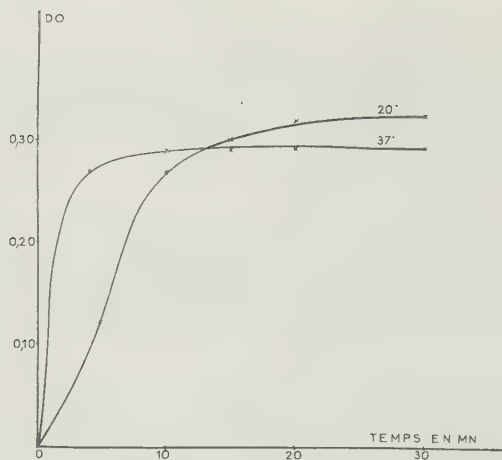
CONCLUSIONS

Nous avons déterminé les conditions optima de la nouvelle réaction créatine - dioxo-2,3 pentane - alpha-naphtol. Elles sont voisines de celles définies pour les deux dicétones précédemment étudiées hormis une concentration plus faible en dioxo-2,3 pentane.

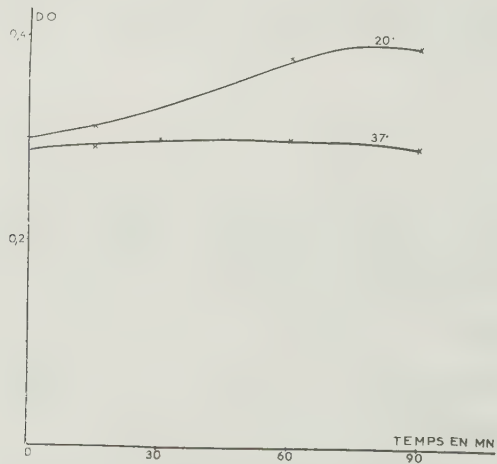
- dioxo-2,3 pentane 2 micromoles
- alpha-naphtol 40 mg
- NaOH 1,5 millimoles

Développement de la coloration : 10 minutes à 37°.

La réaction est cependant moins sensible, ce qui limite son intérêt.



Graphique 15 Cinétique de la réaction créatine-dioxo-2,3, pentane-alpha-naphtol.



Graphique 16 Stabilité de la réaction créatine-dioxo-2,3 pentane-alpha-naphtol.

2 - REACTION CREATINE - DIOXO-2,3 PENTANE, ORCINOL

Nous avons mis en évidence dans les chapitres précédents l'intérêt de l'orcinol et de la glucuronolactone. Etant donné l'analogie du dioxo-2,3 pentane avec les deux premières dicétones, il était logique de s'attendre à ce que ces deux composés améliorent aussi la réaction du dioxo-2,3 pentane.

Effectivement le remplacement de l' α -naphthol par l'orcinol conduit à une réaction deux fois plus sensible : l'intensité des colorations passant de 29 centièmes de D.O. à 68 pour 200 nanomoles de créatine. L'introduction d'orcinol entraîne un léger décalage du maximum d'absorption des colorations (530 à 520 nm). La concentration la plus favorable est ici aussi, de 50 micromoles (tableau 27).

Tableau 27 : Définition de la concentration optima d'orcinol (créatine 200 n M)

Orcinol (micro- moles	10		20		50		100		150		300	
	Té- moin	Do- sage	Té- moin	Do- sage	Té- moin	Do- sage	Té- moin	Do- sage	Té- moin	Do- sage	Té- moin	Do- sage
Lecture après 10'	0,03	0,49	0,04	0,63	0,10	0,68	0,11	0,70	0,15	0,68	0,24	0,48
Lecture après 2 h	0,04	0,49	0,06	0,56	0,17	0,59	0,21	0,63	0,22	0,64	0,44	0,66

Dans ce tableau, on remarque qu'avec le dioxo-2,3 pentane, comme avec les autres dicétones, il se développe une coloration parasite intense. Mais l'addition de la lactone de l'acide glucuronique limite la réaction secondaire.

Nous avons alors défini les meilleures conditions de développement de la réaction en présence d'orcinol et de glucuronolactone en reprenant les différents paramètres.

a - Dioxo-2,3 pentane

En présence d'orcinol et de glucuronolactone, l'effet

inhibiteur d'un excès de dioxo-2,3 pentane est moins intense qu'avec l' α -naphthol, mais la concentration optima (2,5 micromoles) est assez critique (graphique 17).

b - Alcalinité

L'alcalinité optima est celle qui a été définie avec les deux autres dicétones : 1,5 millimoles.

c - Orcinol

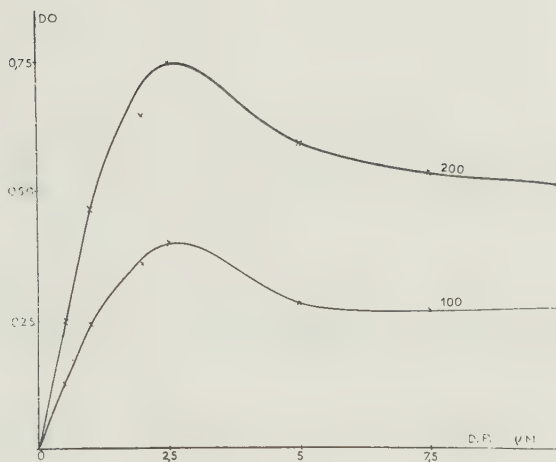
Quel que soit le taux de glucuronolactone, la concentration la plus favorable d'orcinol reste de 50 micromoles (graphique 18).

d - Glucuronolactone

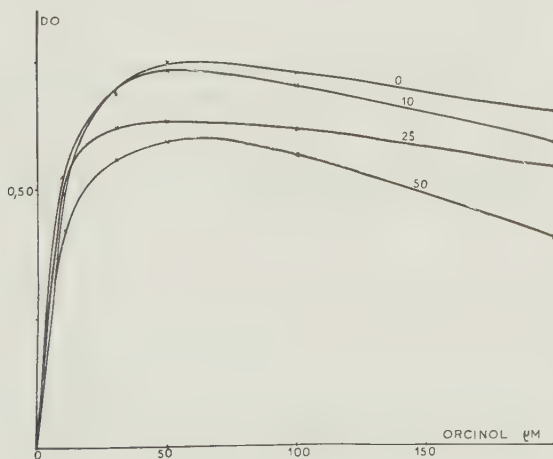
La lactone de l'acide glucuronique influe sur l'intensité et la stabilité de la réaction colorée et le choix de la concentration optima est basé sur ces deux critères.

Tableau 28 : Intensité et stabilité de la réaction en fonction du taux de glucuronolactone (créatine 200 n M)

Glucurono- lactone (micromoles)	0		10		25		50	
	Témoin	Dosage	Témoin	Dosage	Témoin	Dosage	Témoin	Dosage
Lecture après 10 mn	0,07	0,75	0,05	0,73	0,04	0,63	0,03	0,59
30 mn	0,10	0,71	0,05	0,74	0,05	0,67	0,04	0,68
1 h.	0,12	0,70	0,05	0,71	0,05	0,67	0,04	0,66
2 h.	0,16	0,64	0,07	0,63	0,05	0,59	0,04	0,60
3 h.	0,21	0,57	0,10	0,55	0,06	0,58	0,05	0,55



Graphique 17 Réaction créatine-dioxo-2,3 pentane-orcinol :
Variations de l'intensité en fonction du taux
de dicétone pour 100 et 200 nanomoles de
créatine.



Graphique 18 Réaction créatine-dioxo-2,3 pentane-orcinol :
Variations de l'intensité en fonction de la
concentration en orcinol et en glucuronolac-
tone.

On constate (tableau 28) que l'effet de la glucuronolactone sur la réaction créatine - dioxo-2,3 pentane est analogue à celui obtenu avec les deux premières dicétones. Elle empêche le développement de la coloration parasite mais inhibe également la réaction colorée.

Le pouvoir inhibiteur de la lactone est assez marqué puisqu'avec des concentrations supérieures à 10 micromoles, la coloration n'est pas entièrement développée après le bain-marie et qu'elle s'intensifie alors après le chauffage.

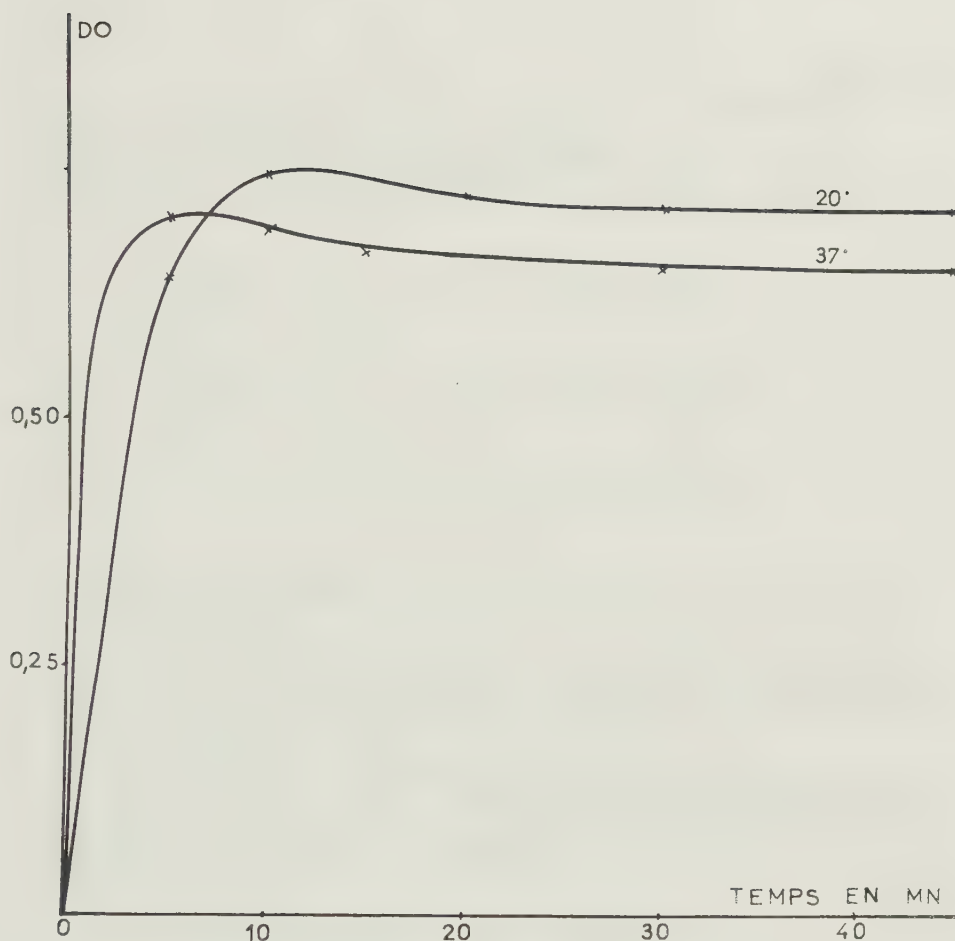
L'introduction de 10 micromoles de composé suffit donc pour obtenir un témoin réactif faible avec une stabilité suffisante.

e - Cinétique - Stabilité

A 20°, la coloration est entièrement développée en 10 minutes et une prolongation du temps de chauffage à 30 minutes ne modifie pas l'intensité. A 37°, le développement de la réaction est plus rapide (graphique 19). Mais la réaction étant plus intense à 20°, c'est cette température que nous choisirons.

La stabilité de la réaction a été étudiée dans le paragraphe précédent puisqu'elle est conditionnée par la concentration en glucuronolactone.

Cependant malgré l'addition de ce composé, la stabilité des colorations ne dépasse pas 30 minutes.



Graphique 19 Réaction créatine-dioxy-2,3
pentane-ortho-1,2 : Cinétique
de la réaction.

CONCLUSIONS

Nous avons déterminé les conditions opératoires les plus favorables pour la nouvelle réaction colorée créatine - dioxo-2,3 pentane en présence d'orcinol et de glucuronolactone. Elles se résument ainsi :

- dioxo-2,3 pentane 2,5 micromoles
- orcinol.....50 micromoles
- glucuronolactone10 micromoles
- NaOH 1,5 millimoles

Développement de la coloration : 15 minutes à 20°.

Lecture à 520 nm après 15 minutes.

Le remplacement de l'alpha-naphtol par l'orcinol et la glucuronolactone améliore très nettement la sensibilité de la réaction.

Les conditions opératoires choisies s'apparentent à celles définies pour les autres dicétones mais la réaction créatine - dioxo-2,3 pentane présente trois particularités :

- plus grande sensibilité au pouvoir inhibiteur de la lactone de l'acide glucuronique. Il suffit de 10 micromoles de composé pour inhiber la coloration parasite.

- cinétique plus régulière et réaction plus intense à 20°.

- stabilité plus limitée malgré l'addition de glucuronolactone.

Dans les conditions opératoires retenues, la réaction est sensible et peut être appliquée au dosage des composés guanidiques. Cependant l'instabilité des solutions de dicétone est un inconvénient qu'on ne peut ignorer.

C H A P I T R E V I

ETUDE COMPARATIVE DES REACTIONS COLOREES ET FLUORIMETRIQUES

GUANIDINES - DICETONES

METHODES MANUELLE ET AUTOMATIQUE

Nous avons décrit, dans le chapitre précédent, les réactions colorées données par la créatine et les alpha-dicétones.

Il nous a paru intéressant de les comparer au point de vue sensibilité et spécificité, à une réaction fluorimétrique de la créatine dont nous avons rapidement défini les conditions optima.

Nous avons également comparé ces différentes réactions après les avoir adaptées à l'analyse en flux continu.

1 - REACTION FLUORIMETRIQUE CREATINE - NINHYDRINE

Nous avons dit dans l'introduction de la première partie de ce travail, que la mise en évidence d'une réaction fluorescente entre les guanidines et la ninhydrine, était dûe aux travaux de FAURE (32) d'une part, CONN et DAVIS (34) d'autre part.

La réaction d'abord appliquée au dosage de la créatine (35), fut ensuite utilisée pour doser les médicaments guanidiques dans les milieux biologiques (48, 49) puis adaptée à la mesure de l'activité de la créatine-phosphokinase en méthode manuelle (50, 51) ou automatique (52).

- Conditions de la réaction créatine - ninhydrine

La créatine réagit avec la ninhydrine en milieu alcoolique et alcalin en émettant une fluorescence verte (maximum d'excitation : 405 nm - maximum d'émission : 500 nm).

En prenant pour base les conditions de CONN (35), nous avons rapidement étudié l'influence des différents paramètres de la réaction.

La fluorescence est développée, sauf indications contraires à 20°, dans un volume final de 6,5 ml ; la prise d'essai est de 50 nanomoles de créatine ; l'intensité de la réaction est mesurée 5 minutes

après l'addition de l'alcalin au spectrofluorescimètre (405 - 500 nm) ou au fluorescimètre avec les filtres les plus proches des maxima d'excitation et d'émission. Les chiffres présentés dans le tableau et les graphiques correspondent à des unités arbitraires de fluorescence.

- Alcalinité

La fluorescence ne se développe qu'en milieu fortement alcalin : pH supérieur à 10 (33).

La base la plus fréquemment utilisée est KOH en solution aqueuse (50) ou alcoolique (35). Bien que la solution alcoolique conduise à une fluorescence légèrement supérieure, elle a été peu employée en raison de sa préparation difficile.

Le réactif alcalin est introduit dans le milieu réactionnel 5 minutes après l'addition de ninhydrine pour permettre la transformation de cette dernière (voir étude du mécanisme de la réaction).

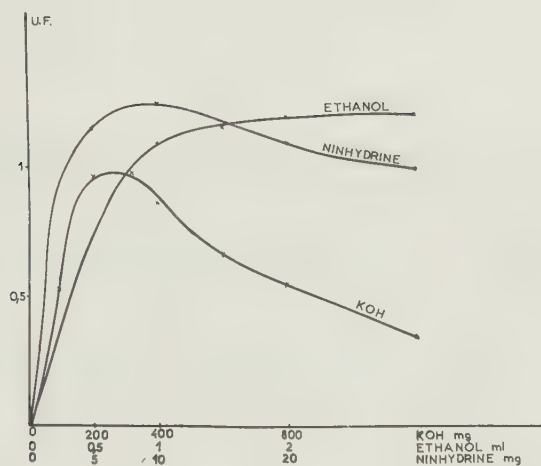
Nos essais ont été réalisés avec KOH en solution aqueuse. Les variations de l'intensité de la fluorescence en fonction de l'alcalinité (graphique 20) montrent que 160 à 320 mg de KOH représentent l'alcalinité optima et que KOH en excès inhibe la fluorescence. Nous avons adopté l'alcalinité choisie par CONN (35) ou SAX et MOORE (53) :

NaOH est équivalent à KOH aux mêmes concentrations.

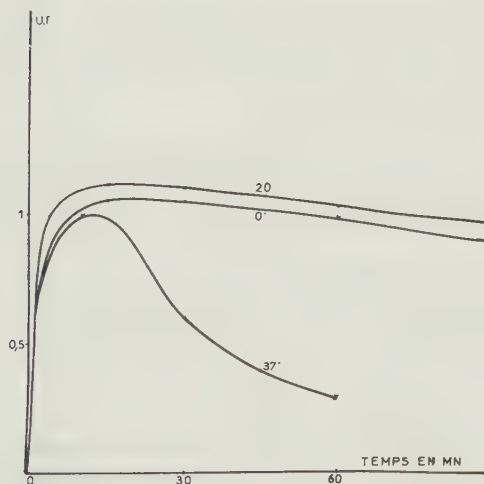
En milieu moins alcalin, la fluorescence ne se développe pas. KOH N, NaOH N, NH_4OH , Na_2CO_3 N, K_2CO_3 N, Li_2CO_3 et baryte en solution saturée).

- Concentration alcoolique

CONN (35) ayant montré que l'éthanol intensifiait fortement la fluorescence, nous avons étudié l'influence des alcools sur la réaction (tableau 29).



Graphique 20 Réaction fluorimétrique créatine-ninhydrine : Influence de la concentration en ninhydrine, KOH et éthanol sur le développement de la fluorescence.



Graphique 21 Cinétique de la réaction fluorimétrique créatine-ninhydrine à différentes températures.

Tableau 29 : Intensité de la fluorescence en présence d'alcools
(créatine 50 nM)

Alcools	Néant	Méthanol	Ethanol	Propanol	Ethylène-glycol
0,5 ml	510	560	730	620	750
2 ml	510	745	1000	1000	375

2 ml d'éthanol ou de propanol doublent l'intensité de la fluorescence. Le méthanol est moins actif tandis que l'éthylène-glycol inhibe la réaction.

Notre choix s'est porté sur l'éthanol qui offre l'avantage supplémentaire de ne présenter habituellement qu'une faible fluorescence parasite. 2 ml d'alcool suffisent pour développer le maximum de fluorescence (graphique 20).

- Taux de Ninhydrine

10 mg de ninhydrine représentent la concentration la plus favorable (graphique 20) bien que l'on n'observe que de faibles variations pour des concentrations comprises entre 5 et 15 mg.

Pour utiliser le pouvoir intensifiant de l'éthanol, nous employons une solution alcoolique de ninhydrine. Nous avons calculé son titre de façon à ce que 2 ml correspondent à la concentration optima.

- Cinétique - Stabilité

A 20°, la fluorescence est entièrement développée en 5 minutes (graphique 21). Elle reste stable pendant 30 minutes à l'abri d'une lumière vive. A 0° la cinétique de la réaction est un peu plus lente mais la fluorescence reste stable 60 minutes.

Le chauffage détruit la fluorescence : baisse de 30% en 30 minutes à 37°. De même la puissance trop grande des lampes à vapeur de mercure de certains fluorimètres peut détruire le complexe fluorescent et rendre la lecture impossible.

- Essais d'amélioration de la sensibilité de la réaction créatine - ninhydrine

Nous avons tenté d'améliorer la sensibilité de la réaction en introduisant dans le milieu réactionnel des solvants autres que les alcools, des sels métalliques ou des dérivés à caractère oxydant ou réducteur.

Les différents composés utilisés aux concentrations définies pour les réactions colorées ont été ajoutés avant l'addition de KOH.

Presque tous les solvants testés inhibent la fluorescence : c'est le cas de l'acétate d'éthyle, l'acétone, l'acétylacétate d'éthyle, l'acétylacétone, l'éthylméthylcétone, le méthylal.

Seul le dioxane est sans action sur le développement du complexe fluorescent.

Nous avons testé les mêmes sels métalliques que ceux utilisés en colorimétrie, et nous avons retrouvé le pouvoir inhibiteur intense des sels de cuivre et de cobalt.

On constate également le développement d'une coloration bleue avec les sels d'argent et l'apparition d'une fluorescence parasite avec les sels mercuriques et le sulfate de nickel.

Peu d'oxydants modifient le développement de la fluorescence.

- Nous avons seulement noté le fort pouvoir inhibiteur (80%) du ferricyanure de potassium, même en solution 0,001 M.

- En présence de chlorate, arséniate, nitrate de sodium ou d'acide arsénique, l'intensité de la fluorescence reste identique à celle du témoin sans oxydant.

- Avec le permanganate de potassium, on observe une précipitation et pour des solutions plus diluées, l'apparition d'une coloration bleue.

- Les substances à caractère oxydant ne modifient pas la stabilité de la fluorescence.

Avec les composés à caractère réducteur, il apparaît que :

- L'hydroquinone et le sulfate d'hydrazine possèdent un fort pouvoir inhibiteur.

- Le nitrite de sodium toujours inactif en colorimétrie, inhibe légèrement la fluorescence.

- Le sulfate de sodium ne modifie pas la réaction.

- L'effet de l'acide ascorbique est masqué par le développement d'une coloration bleue ; mais en fluorescence, le pouvoir inhibiteur de ce composé est plus faible que celui de l'hydroquinone ou du sulfate d'hydrazine.

- Il se développe avec certains de ces composés des colorations parasites qui inhibent la fluorescence.

- L'introduction de composés réducteurs ne modifient pas la stabilité de la fluorescence.

Conclusions

Nous confirmons les résultats de CONN (35) : le développement de la fluorescence nécessite un milieu alcoolique et alcalin. L'introduction de l'alcalin doit se faire 5 minutes après celle de la ninhydrine pour permettre la transformation de cette dernière. La fluorescence est détruite par chauffage ou la lumière vive.

Peu de solvants, cations ou composés à caractère oxydant ou réducteur modifient la réaction ; mais les composés actifs possèdent un pouvoir inhibiteur marqué.

Les conditions optima de la réaction créatine-ninhydrine se définissent donc ainsi, pour un volume final de 6,5 ml.:

- solution alcoolique de ninhydrine 0,02 M 2 ml

Attendre 5 minutes.

- solution KOH 40 % 0,5 ml

- Lire la fluorescence (405 - 500 nm) 5 minutes après l'addition de l'alcalin.

II - COMPARAISON DES REACTIONS GUANIDINES - DICETONES

L'étude de la réactivité des guanidines et des alpha-dicétones nous a permis de définir les conditions les plus favorables au développement de complexes colorés : en présence d'alpha-naphtol ou d'orcinol, trois alpha-dicétones réagissent en milieu alcalin avec la créatine : le dioxo-2,3 butane, le dioxo-2,3 phényl-3 propane et le dioxo-2,3 pentane.

Le dioxo-2,3 butane est la dicétone la plus stable : en solution 0,1 M, elle peut être conservée trois mois alors que la stabilité des solutions des deux autres dicétones n'excède pas 24 h.

La mise au point des conditions opératoires a été réalisée avec la créatine ; mais d'autres guanidines sont présentes dans les milieux biologiques, en particulier : l'arginine, la créatinine et la glycocyamine.

C'est pourquoi nous avons déterminé la réactivité de ces derniers composés dans les conditions opératoires définies aux chapitres précédents.

Nous avons également comparé (tableau 32) nos résultats à ceux obtenus d'une part avec la méthode de RAAFLAUB et ABELIN (12) souvent utilisée, d'autre part avec la technique fluorimétrique dont nous avons redéfini les conditions.

L'examen du tableau 30 montre que :

- L'orcinol en présence de glucuronolactone, sensibilise nettement les trois réactions et surtout celle du dioxo-2,3 pentane. Les colorations les plus intenses sont celles développées en présence de dioxo-2,3 butane et d'orcinol.

- L'interférence des autres composés guanidiques ne peut être niée : en présence d'alpha-naphtol, elle reste identique quelle que soit la dicétone utilisée ; avec l'orcinol, au contraire, l'arginine et la glycocyamine interfèrent plus avec le dioxo-2,3 butane ou le dioxo-2,3 phényl-3 propane qu'avec la troisième dicétone. Mais dans les six conditions opératoires décrites l'interférence de la créatinine, principal dérivé guanidique présent dans les milieux biologiques, a été fortement réduite.

Tableau 30 : Intensité des réactions colorées guanidines-alpha-dicétones (résultats obtenus avec 200 nanomoles de composé)

Conditions	Créatine		Arginine		Glycocy- amine		Créati- nine	
	D.O.	%	D.O.	%	D.O.	%	D.O.	%
RAAFLAUB et ABELIN (12)	0,34	100	0,18	52	0,06	17	0,15	44
Dioxo-2,3 butane- naphtol-1	0,60	100	0,18	30	0,21	35	0,10	17
Dioxo-2,3, phényl-3 propane-naphtol-1	0,37	100	0,14	37	0,18	48	0,07	18
Dioxo-2,3 pentane- naphtol-1	0,29	100	0,095	32	0,09	31	0,05	17
Dioxo-2,3 butane-orcinol	0,99	100	0,59	59	0,43	43	0,15	15
Dioxo-2,3, phényl-3 propane-orcinol	0,53	100	0,32	61	0,24	45	0,07	13
Dioxo-2,3 pentane-orcinol	0,67	100	0,25	37	0,18	26	0,10	14

Alors qu'avec les conditions de RAAFLAUB et ABELIN on ne pouvait doser moins de 60 nanomoles de créatine, on peut en détecter 30 avec le dioxo-2,3 butane et l'alpha-naphtol et le seuil de sensibilité est abaissé à 15 nanomoles avec le dioxo-2,3 butane et l'orcinol.

Nous avons représenté dans le tableau 31 les résultats obtenus en fluorescence : comme on pouvait le supposer, la méthode fluorimétrique est la plus sensible ; elle permet de détecter 10 nanomoles de créatine.

Tableau 31 : Intensité des réactions fluorescentes guanidines - ninhydrine (résultats obtenus avec 50 nanomoles de composé)

Composés	Intensité	Pourcentage
Créatine	42	100
Arginine	10	23
Glycocyamine	17	39
Créatinine	7	16

L'interférence des autres guanidines reste du même ordre que celle observée avec les méthodes colorimétriques les plus spécifiques.

L'étude comparative des réactions guanidines - alpha-dicétones démontre que sensibilité et spécificité ne vont pas de pair : la réaction la plus intense est celle développée avec le dioxo-2,3 butane et l'orcinol tandis que deux autres réactions sont plus spécifiques : dioxo-2,3 butane - alpha-naphtol et dioxo-2,3 pentane - orcinol.

Nous avons tenté d'accroître la spécificité de la réaction la plus sensible en inhibant les composés guanidiques autres que la créatine.

Nos essais sont basés sur les travaux de TOI et coll. (53) et ceux de NAKAYA et coll. (54).

Pour déterminer la séquence des amino-acides des protéines et pour rechercher plus particulièrement l'arginine, ces auteurs bloquent le groupement guanidique de l'arginine respectivement avec la cyclohexane-1,2 dione ou le dioxo-2,3 propane et le dioxo-2,3 butane.

Malheureusement le pouvoir inhibiteur de la cyclohexane-1,2 dione vis-à-vis de l'arginine, se retrouve avec la créatine et rend nos essais inapplicables.

Il n'est donc pas possible de doser spécifiquement la créatine ; cependant dans le cas de la mesure de l'activité de la créatinephosphokinase, la créatine libérée est en si grande quantité que les autres guanidines n'interfèrent pratiquement plus.

III - ADAPTATION DES REACTIONS COLOREES GUANIDINES - ALPHA-DICETONES A L'ANALYSE EN FLUX CONTINU

La réaction guanidine - dioxo-2,3 butane a été adaptée à l'analyse en flux continu pour le dosage des dérivés guanidiques (16, 29) ou de la créatinephosphokinase (42, 43, 52). Les colorations étaient développées en présence d'alpha-naphtol.

Ayant mis en évidence le pouvoir intensifiant de l'orcinol, nous avons voulu, en méthode automatique remplacer l'alpha-naphtol par l'orcinol. Nous avons alors comparé la réactivité des trois alpha-dicétones précédemment étudiées.

- Définition des conditions de la réaction

Nous nous sommes basée sur les résultats obtenus en méthode manuelle, en adaptant les volumes et les concentrations au principe des volumes / minute pompés par l'appareil.

L'alcalinité et les concentrations de dicétones et d'orcinol définies en méthode manuelle restent valables.

Avec l'analyse en flux continu, l'intensité des complexes colorés est mesurée avant le développement complet des réactions ; dans ce cas, la coloration parasite apparue en présence d'orcinol est encore faible et l'addition de glucuronolactone est moins utile.

La réaction est suffisamment sensible pour être mesurée trois minutes après l'addition de NaOH. Si l'on augmente le temps de développement de la réaction en multipliant le nombre de bobines de mélange, l'intensité de la réaction créatine - dioxo-2,3 butane est peu augmentée par rapport à celle des autres guanidines (tableau 32).

Tableau 32 : Intensité des réactions guanidines - dioxo-2,3 butane en fonction du temps de développement de la coloration.

Temps de développement de la coloration	Créatine	Arginine	Glycocy-amine	Créatinine
3 minutes	0,67	0,21	0,12	0,09
9 minutes	0,88	0,37	0,24	0,13
% d'augmentation	31	76	100	55

Ces résultats appuient sans toutefois confirmer entièrement ceux de TEMPE et coll. (55) qui avaient montré qu'avec l' α -naphtol, la coloration de la créatine était maxima en 2,5 minutes alors que celle des autres guanidines n'était entièrement développée qu'après plus de 10 minutes.

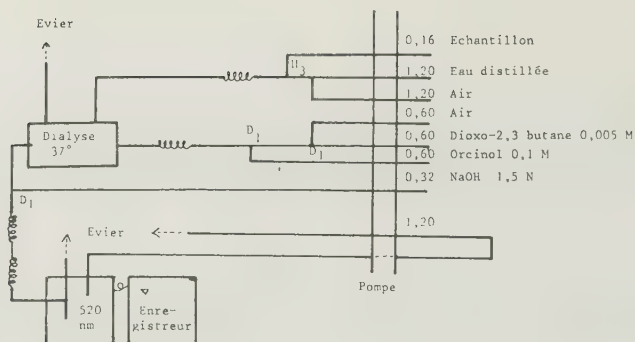
- Diagramme des flux

Les essais précédents nous ont permis d'établir les conditions de l'analyse en flux continu. Elles sont représentées dans le diagramme des flux ci-après.

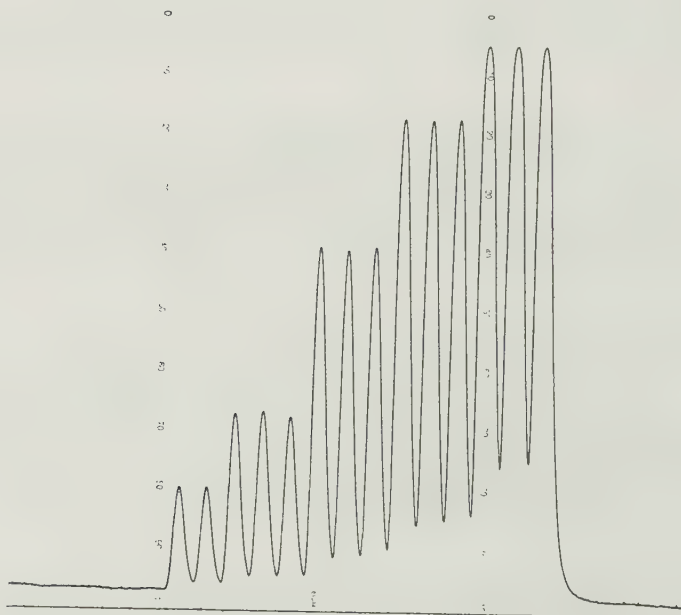
La courbe d'étalonnage (graphique 22) met en évidence la grande sensibilité de la méthode.

- Comparaison de la réactivité des α -dicétones

En méthode manuelle, quelle que soit la dicétone, les concentrations les plus favorables sont pratiquement identiques. Pour cette raison, nous avons comparé la réactivité du dioxo-2,3 butane, du dioxo-2,3 phényl-3 propane et du dioxo-2,3 pentane, dans les conditions définies pour la première dicétone.



Légende : Dosage automatique de la créatine :
Diagramme des flux.



Graphique 22 Analyse en flux continu :
Tracé d'étalonnage.

Nous avons également vérifié l'intensité des colorations développées avec l'arginine, la glycoxyamine et la créatinine. Les résultats sont regroupés dans le tableau 33.

On constate que :

- les colorations les plus intenses sont obtenues avec le dioxo-2,3 butane.

- dans les conditions choisies, le dioxo-2,3, phényl-3 propane est peu réactif.

- l'interférence de l'arginine et de la glycoxyamine est très nettement réduite par rapport aux résultats obtenus en méthode manuelle ; elle est identique avec le dioxo-2,3 butane et le dioxo-2,3 pentane.

- la différence de résultats constatés en méthode manuelle et avec l'analyse en flux continu s'explique en étudiant la cinétique des réactions et si l'on sait que l'intensité des colorations est lue avant le développement complet des réactions.

- Nous avons en effet montré que parmi les guanidines, la créatine est le composé réagissant le plus rapidement ; d'autre part, nous avons mis en évidence que la cinétique de la réaction créatine-dioxo-2,3, phényl-3 propane était plus lente que celle du dioxo-2,3 butane (chapitre IV).

Tableau 33 : Comparaison de la réactivité des alpha-dicétones et des composés guanidiques (solution 0,0005 M).

	Créatine		Arginine		Glycoxy- amine		Créati- nine	
	D.O.	%	D.O.	%	D.O.	%	D.O.	%
Dioxo-2,3 butane	0,67	100	0,21	31	0,12	17	0,09	13
Dioxo-2,3, phényl-3 propane	0,05	100	0,03	60	0,025	50	0,01	20
Dioxo-2,3 pentane	0,33	100	0,09	27	0,05	15	0,045	14

L'adaptation des réactions guanidines - alpha-dicétones à l'analyse en flux continu permet d'améliorer encore la sensibilité et la spécificité des réactions créatine - dioxo-2,3 butane et créatine - dioxo-2,3 pentane, ce qui représente un avantage certain par rapport à la méthode manuelle.

CONCLUSIONS

La comparaison des réactions créatine - dicétones a montré qu'en colorimétrie la réaction la plus sensible était celle de la créatine et du dioxo-2,3 butane-orcinol.

Alors qu'avec les conditions initiales de RAAFLAUB et ABELIN (12) on ne pouvait doser moins de 60 nanomoles de créatine, on peut en déceler 30 avec le dioxo-2,3 butane et l'alpha-naphtol et le seuil de sensibilité est abaissé à 15 nanomoles si l'on remplace l'alpha-naphtol par l'orcinol.

La réaction fluorimétrique créatine - ninhydrine est encore plus sensible : elle permet de déceler 10 nanomoles de créatine.

Cependant le remplacement de l'alpha-naphtol par l'orcinol modifie peu, sauf pour la créatinine la spécificité des réactions et l'interférence des autres dérivés guanidiques ne peut être niée : Elle est du même ordre avec les réactions colorées et fluorimétriques mais peut être réduite avec l'analyse en flux continu.

Dans ce dernier cas la réaction créatine-dioxo-2,3 butane-orcinol représente la réaction la plus sensible et la plus spécifique.

CHAPITRE VII

DONNEES SUR LA NATURE DES COMPLEXES COLORES ET FLUORESCENTS

1 - REACTION COLOREE GUANIDINE - DICETONE

Bien que la réaction guanidique - dicétone soit utilisée depuis longtemps, on ne connaît pas encore la structure des complexes colorés formés.

Afin d'établir d'éventuelles hypothèses sur le mécanisme de la réaction, nous avons repris l'étude des deux groupes de composés mis en jeu, guanidines et dicétones, puis nous avons tenté de déterminer la formule des complexes colorés par la méthode des variations continues.

- Composés guanidiques

La réaction a lieu avec de nombreux dérivés guanidiques de type $H_2N - C - R$ (4,6,29). La coloration se développe aussi bien avec

"

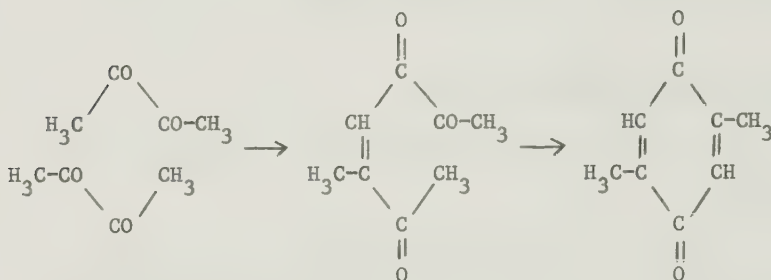
NH

les guanidines monosubstituées (arginine) qu'avec les composés disubstitués (créatine) ou les biguanides (diméthyl-N, N biguanides). La réaction dépend cependant de la nature du radical R puisque les composés suivants conduisent à des résultats négatifs : méthylguanidine (4), aminoguanidine (4,13).

Toutes les réactions positives présentent les mêmes caractéristiques au point de vue spectre d'absorption, ce qui nuit à la spécificité de la réaction colorée et oblige souvent à isoler préalablement le composé à doser ou à éliminer les autres dérivés guanidiques.

- Dicétones

PECHMANN (56) a démontré que le dioxo-2,3 butane conduisait par chauffage en milieu alcalin à des réactions de condensation de type :



A la suite de ces travaux et après avoir contrôlé l'activité de nombreuses dicétones, LANG (30) établissait que pour réagir, les dicétones devaient être des alpha-dicétones possédant un groupement méthyle terminal en alpha du carbonyle.

Afin de vérifier les constatations de LANG, nous avons étudié la réactivité d'une série dicétones alpha ou bêta, linéaires ou cyclaniques ; certaines avaient été testées en milieu alcalin par HARDEN et NORRIS (4), BARRITT (6) ou LANG (30) ou en milieu acide par SIEST (1).

Le tableau ci-contre indique les résultats obtenus :

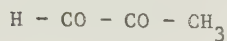
- aucune coloration ne se développe avec les alpha ou bêta dicétones linéaires suivantes : glyoxal, benzile, dioxo-2,4 pentane.

- il en est de même avec les dicétones cyclaniques, et même avec la cyclohexane-1,2, dione, connue pour réagir en milieu acide avec les dérivés carbamidés (1).

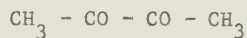
Quatre dicétones seulement réagissent avec la créatine : ce sont, conformément aux constatations de LANG, des dérivés possédant deux fonctions cétoniques contigües en alpha et un groupement méthyle libre en alpha du carbonyle.

Les colorations les plus intenses sont obtenues avec le dioxo-2,3 butane et son homologue supérieur le dioxo-2,3 pentane. En

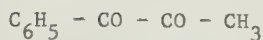
I - DICETONES DONNANT UNE REACTION POSITIVE AVEC LES DERIVES GUANIDIQUES



Dioxo-2,3 propane



Dioxo-2,3 butane



Dioxo-2,3, phényl-3 propane



Dioxo-2,3 pentane

II - DICETONES NE DONNANT PAS DE REACTION COLOREE AVEC LES DERIVES GUANIDIQUES



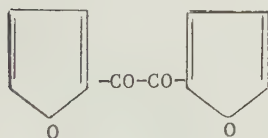
Glyoxal



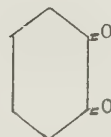
Benzile



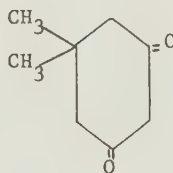
Dioxo-2,4 pentane



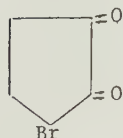
Furile



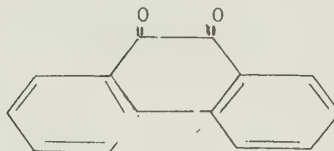
Cyclohexane 1-2 dione



Diméthyl-5-5 cyclohexane 1-3 dione



Bromo-3 cyclopentane-1-2 dione

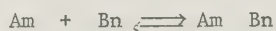


Phénanthrènequinone-9,10

présence de dioxo-2,3 propane, la coloration se développe lentement et reste faible. L'introduction d'un groupement phényle (dioxo-2,3, phényl-3 propane) déplace le maximum d'absorption à 570 nm (coloration bleue violette).

- Essais de détermination des formules des complexes colorés par la méthode des variations continues.

Ce procédé mis au point par JOB (57) permet de déterminer les proportions relatives de deux substances A et B formant un complexe coloré AB.



Si on mélange des quantités variables de solutions contenant respectivement A et B, certaines propriétés physicochimiques du mélange AB (viscosité - indice de réfraction - conductibilité - absorption lumineuse) varient avec la composition. Les propriétés sont maxima lorsque le mélange aura la composition Am Bn, permettant donc de déterminer le rapport $\frac{Am}{Bn}$.

Bn

JOB a montré que cette composition, qu'il appelle composition maxima, est indépendante du titre des solutions employées, à condition que celles-ci soient toujours équimoléculaires.

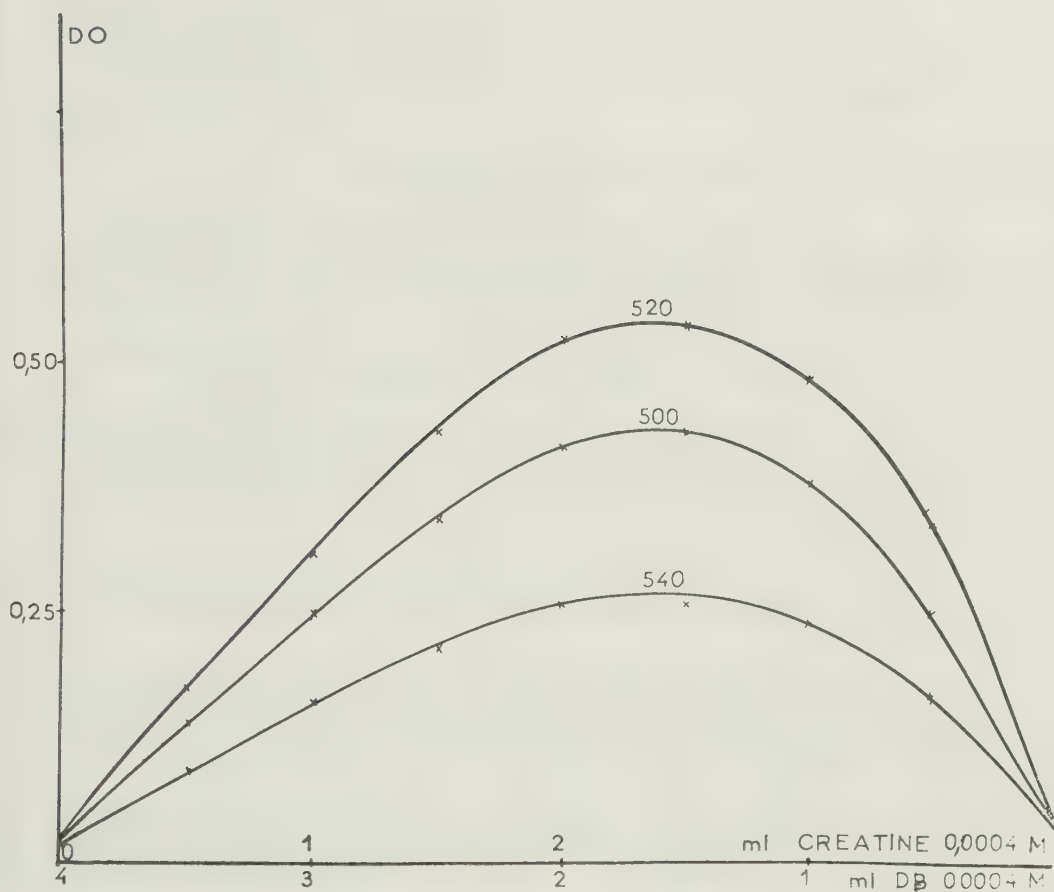
Nous avons mesuré les variations de l'absorption lumineuse des mélanges en suivant la technique de LAZARE (58).

Nous avons fait réagir les guanidines et les dicétones dans les conditions opératoires précédemment décrites.

Les résultats sont identiques quelles que soient les conditions mais ils sont assez difficilement interprétables : l'intensité des colorations est maxima avec les mélanges contenant 5 molécules de guanidines et 3 molécules de dicétones ; mais les colorations sont presque aussi intenses avec des quantités égales de guanidines et de dicétones.

Le graphique 23 est un exemple des courbes obtenues.

L'intensifiant ajouté au milieu réactionnel ne modifie pas les proportions relatives des composants du complexe coloré.



Graphique 23 Réaction créatine-dioxo-2,3
butane-orcinol : Détermination
des formules des composés
colorés par la méthode des
variations continues.

Il semble donc hasardeux de proposer une formule des complexes colorés formés : cependant nos essais confirment la formule de LANG dans laquelle entre deux molécules de dicétones et trois molécules de guanidines.

2 - REACTION FLUORIMETRIQUE CREATINE - NINHYDRINE

Les travaux de CONN et DAVIS (34), YAMADA et ITANO (59) ont montré que la réactivité des guanidines variait avec leur structure : les guanidines disubstituées comme la créatine réagissent différemment des composés monosubstitués comme l'arginine.

C'est pourquoi nous avons jugé utile d'effectuer des essais avec la créatine et l'arginine. Nous avons testé la réactivité :

- des composés cités dans la littérature pour doser ou révéler fluorimétriquement les dérivés guanidiques : ninhydrine (35), naphtoquinone-1,2, sulfonate-4 de sodium (60, 61) o.phtalaldéhyde (62), phénanthrène quinone-9,10 (59, 63), dichloro-2,4, naph1-1 (64).

- des dérivés de structure voisine

- des dicétones donnant une réaction colorée avec les guanidines.

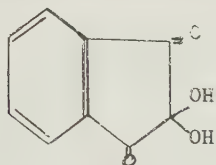
Nous avons regroupé dans le tableau ci-contre les résultats de nos investigations et nous avons comparé dans le tableau 34, l'activité et les maxima de fluorescence des composés actifs avec l'arginine et la créatine.

- La ninhydrine est le seul composé provoquant une fluorescence plus intense avec les guanidines disubstituées tandis que la naph-toquinone-1,2, sulfonate-4 de sodium est plus spécifique des dérivés monosubstitués.

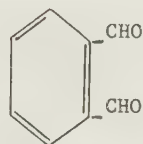
- L'o.phtalaldéhyde et la phénanthrénequinone-9,10 ne réagissent qu'avec l'arginine.

- Si les composés sont fluorescents à la fois avec la créatine et l'arginine, les spectres de fluorescence présentent les mêmes maxima.

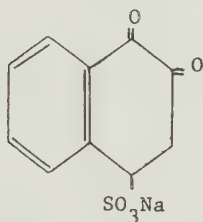
I - COMPOSES PROVOQUANT LE DEVELOPPEMENT D'UNE REACTION FLUORESCENTE



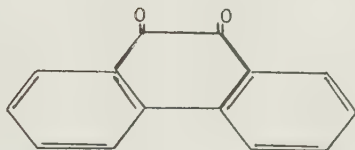
Dihydroxy-2,2, dioxo-1,3 hydrindène
(ninhydrine)



o. phthalaldéhyde



Naphtoquinone-1,2, sulfonate-4
de sodium

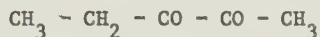


Phénanthènequinone-9,10

II - COMPOSES DONNANT UNE REACTION NEGATIVE AVEC LES DERIVES GUANIDIQUES



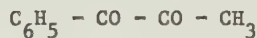
Dioxo-2,3 butane



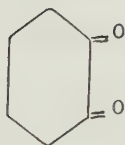
Dioxo-2,3 pentane



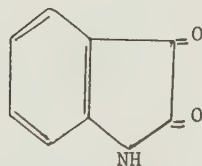
Dioxo-2,3 propane



Dioxo-2,3, phényl-3 propane



Cyclohexane-1,2 dione



Indoldione-2,3 (Isatine)

Tableau 34 : Activité et maximum de fluorescence des composés actifs (spectres non corrigés, enregistrés au spectrofluorimètre Fluorispec Baird Atomic.*)

	Créatine			Arginine		
	Acti- vité	Maximum de fluorescence Exci- tation	Emis- sion	Acti- vité	Maximum de fluorescence Exci- tation	Emis- sion
Ninhydrine	++	405	500	+	405	500
o. phtalaldehyde	-			++	355	475
Naphtoquinone-1,2 Sulfonate-4 de sodium	+	368	462	++	368	462
Phénanthrenequinone-9,10	-			++	390	500

Il apparait que les alpha-dicétones sont peu réactives. Nous n'avons pas obtenu de réaction positive avec le dioxo-2,3 butane : ce résultat est contraire aux observations de VOGES et PROSKAUER (2) puis de HARDEN et NORRIS (4) qui sont à l'origine des méthodes de dosage colorimétrique de la créatine.

On peut penser que la fluorescence observée était dûe aux impuretés du dioxo-2,3 butane car elle n'a jamais été signalée depuis.

Nous avons seulement observé le développement d'une fluorescence parasite après addition d'alpha-naphtol.

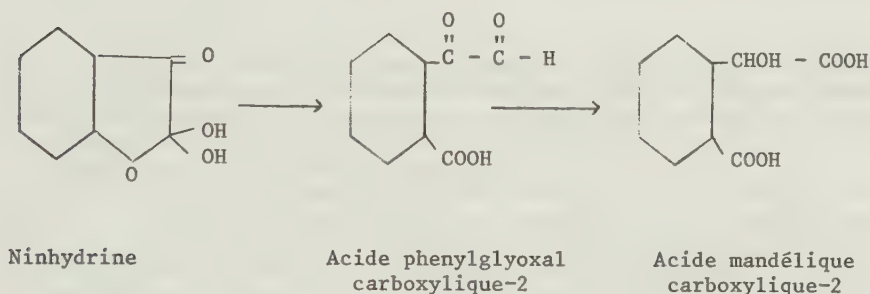
* Nous adressons nos vifs remerciements à Monsieur le Doyen BERNANOSE qui a bien voulu mettre à notre disposition le spectrofluorimètre Fluorispec.

- Structure des produits fluorescents

Il semble difficile de proposer un schéma pour toutes les réactions fluorescentes car les conditions de réaction diffèrent selon le composé utilisé : la fluorescence de la ninhydrine et celle de l'o. phtalaldehyde sont détruites en milieu acide, alors que celle de la phénanthrène quinone est exaltée.

La réaction guanidine - ninhydrine est la plus connue. CONN et DAVIS (34) en ont proposé un schéma : il y aurait ouverture du noyau pentagonal de la ninhydrine avec formation d'acide phénylglyoxal - carboxylique-2. Ce dernier réagirait avec les guanidines possédant un groupement NH_2 libre, la liaison se faisant par les deux fonctions cétoniques contigües de l'acide phénylglyoxal - carboxylique-2.

L'acide phénylglyoxal carboxylique-2 interfère dans la réaction fluorescente mais en milieu fortement alcalin, il est transformé en acide mandélique carboxylique-2 non fluorescent.



Il n'est pas certain que le mécanisme proposé par CONN et DAVIS (34) soit valable pour les autres composés. FAURE et BLANQUET (56) ont cependant suggéré un mécanisme similaire pour le naphto-quinone-1,2, sulfonate-4 de sodium étant donné l'analogie des deux réactions.

CONCLUSIONS

L'étude des réactions colorées guanidines - dicétones nous a permis d'appuyer la théorie de LANG : nous avons montré que, pour réagir les dicétones devaient être des alpha-dicétones possédant un groupement méthyle libre en alpha du carbonyle.

Nous avons également mis en évidence deux nouvelles réactions avec le dioxo-2,3 pentane et le dioxo-2,3 propane. Mais seule la première est utilisable.

Les essais de détermination de la formule des complexes colorés ne nous permettent pas de conclure ; cependant les résultats obtenus semblent confirmer la formule proposée par LANG, dans laquelle entrent 3 molécules de guanidine et deux molécules de dicétone.

Nous avons pu, en fluorescence, confirmer les travaux de CONN et DAVIS (34) ainsi que ceux de YAMADA et ITANO (58) ; nous avons démontré que les guanidines disubstituées comme la créatine réagissent différemment des composés monosubstitués comme l'arginine.

La ninhydrine est le dérivé provoquant une fluorescence plus intense avec les guanidines disubstituées, tandis que les autres composés sont plus spécifiques des dérivés monosubstitués.

Il semble difficile de proposer un schéma du mécanisme des réactions fluorimétriques ; nous avons repris celui de CONN et DAVIS mais il n'est pas certain qu'un schéma analogue soit valable pour les autres réactions.

CHOIX D'UNE METHODE

L'étude des réactions colorées des dérivés guanidiques et des alpha-dicétones a montré que trois dicétones réagissent avec les guanidines : le dioxo-2,3 butane, le dioxo-2,3, phényl-3 propane et le dioxo-2,3 pentane ; la première dicétone était la seule utilisée (11, 12, 13, 14) ; le dioxo-2,3, phényl-3 propane n'avait pas été repris, à notre connaissance, depuis les travaux de LANG (30) tandis que la réaction créatine - dioxo-2,3 pentane n'avait jamais été mise en évidence.

La réaction développée en milieu alcalin est intensifiée par l'addition d'adjuvant : depuis les travaux de BARRITT (6), on utilisait l'alpha-naphtol. Mais nous avons établi que la sensibilité des réactions colorées peut être au moins doublée en remplaçant l'alpha-naphtol par l'orcinol. Cependant avec l'orcinol, il se développe une coloration parasite que nous avons réussi à stabiliser par addition de glucuronolactone.

Nous avons défini pour chaque dicétone, les conditions les plus favorables des réactions développées en présence d'alpha-naphtol ou d'orcinol et de glucuronolactone et nous avons montré qu'il existait une grande analogie entre les trois dicétones :

- conditions optima très voisines
- comportement identique vis à vis du pouvoir inhibiteur des solvants, de certains composés à caractère oxydant ou réducteur, des cations.
- intensification marquée en présence d'orcinol
- formule probable des complexes colorés identique.

Cependant nous avons pu mettre en évidence quelques différences :

- l'instabilité des solutions de dioxo-2,3, phényl-3 propane et du dioxo-2,3 pentane
- la cinétique plus lente de la réaction créatine - dioxo-2,3, phényl-3 propane
- la plus grande sensibilité de la réaction créatine - dioxo-2,3 pentane, au pouvoir inhibiteur de la glucuronolactone.

Nous avons adapté à l'analyse en flux continu, les conditions définies pour les trois dicétones en présence d'orcinol.

Nous avons comparé ces réactions en nous référant à la méthode de RAAFLAUB et ABELIN (12) et à une réaction fluorimétrique de la créatine avec la ninhydrine dont nous avons redéfini les conditions.

Cette comparaison a montré qu'en méthode manuelle ou automatique, la réaction créatine - dioxo-2,3 butane était la plus sensible ; de plus, elle permet d'utiliser des réactifs stables.

Cependant elle est moins spécifique que la réaction créatine-dioxo-2,3 pentane. Cet inconvénient est réduit si on pratique l'analyse en flux continu.

Le manque de spécificité réduit le domaine d'application de la réaction qui ne peut être utilisée pour doser la créatine des milieux biologiques. Par contre la réaction créatine - dioxo-2,3 butane est aisément applicable à l'étude de la créatinephosphokinase en méthode manuelle comme en méthode automatique.

Dans ce dosage, en effet, l'interférence des guanidines est limitée : prise d'essai réduite, défécation éliminant l'arginine, créatine libérée en très grande quantité par rapport aux guanidines présentes.

Annexe : TECHNIQUE DE DOSAGE DE LA CREATINE

REACTIFS

I : solution stock de dioxo-2,3 butane 0,1 M

. dioxo-2,3 butane Fluka 0,86 g
. eau distilléeq.s.p 100 ml

II : solution de dioxo-2,3 butane 0,005 M.

. obtenue par dilution au 1/20e de la solution stock

III : réactif orcinol - glucuronolactone

. orcinol R.P. 0,62 g
. glucuronolactone 0,45 g
. eau distilléeq.s.p 100 ml

IV : NaOH 1,5 N

V : solution stock de créatine 0,01 M

. créatine Merck 0,131 g
. eau distilléeq.s.p 100 ml

VI : solution diluée de créatine 0,0002 M

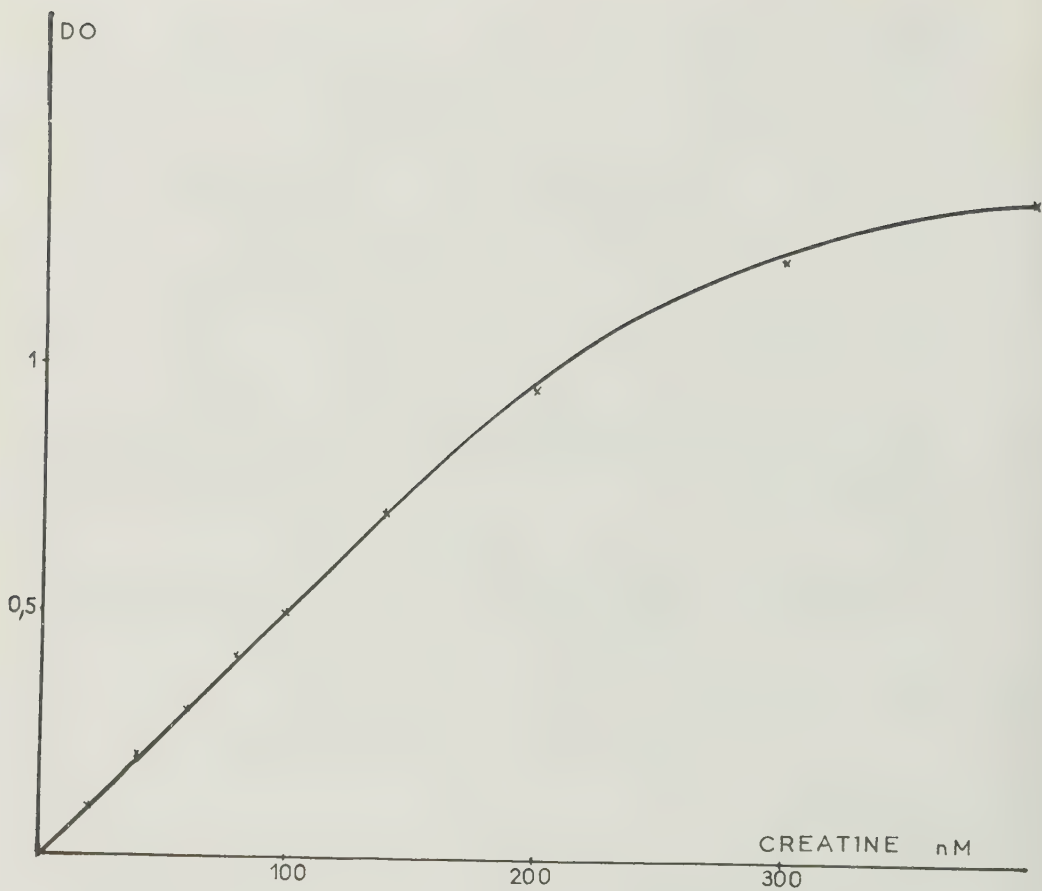
. pardilution au 1/50e de la solution stock

MODE OPERATOIRE

- prise d'essai de créatine 15 à 250 nano-
moles
- eau distilléeq.s.p 3 ml
- solution de dioxo-2,3 butane 0,005 M 1 ml
- réactif orcinol-glucuronolactone 1 ml
- NaOH 1,5 N 1 ml

Mélanger. Porter 10 minutes au bain-marie à 37°. Lire à 520 nm après 10 minutes de refroidissement.

Le graphique 23 bis représente la courbe d'étalonnage obtenue dans ces conditions.



DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE LA CREATINEPHOSPHOKINASE

Introduction :

Grâce aux progrès effectués ces dernières années dans les méthodes d'extraction, de séparation, de purification des protéines, il est possible de garder intactes après ces opérations, les structures secondaire, tertiaire ou quaternaire des macromolécules très fragiles que sont les enzymes. Auparavant une préparation enzymatique réalisée au laboratoire était hétérogène parce que contaminée par des produits dénaturés. Lorsque les chercheurs retrouvaient séparées des molécules ayant une même activité enzymatique, ils ne pouvaient penser qu'à des artefacts dus à la préparation et non à une hétérogénéité initiale dans la cellule.

Bien que l'on ait donc connu des enzymes isofonctionnelles auparavant, ce n'est réellement qu'à partir de 1959 que l'on a étudié en détails leurs différences de structure. C'est à cette date que MARKERT et MOLLER (65) ont introduit la dénomination d'isoenzymes pour les cinq fractions à activité déshydrogénase lactique séparées par électrophorèse.

Ce terme d'isoenzymes (ou isozymes) correspond aux formes différentes sous laquelle existent des protéines ayant la même spécificité enzymatique.

Mais le terme d'isoenzymes ne recouvre qu'une constatation technique. Il n'explique pas les phénomènes biologiques et les structures physicochimiques qui sont à l'origine de ce fractionnement. Si l'on considère ce dernier point de vue, il y a plusieurs types d'isoenzymes :

- des fractions différentes par leur structure primaire :

- soit par clivage partiel d'une chaîne polypeptidique
 - soit par fixation (conjugaison) d'une petite ou grande molécule, souvent un effecteur allostérique

- des isoenzymes ayant une structure tertiaire, variable c'est-à-dire présentant plusieurs dispositions dans l'espace, suffisamment stables.

- des formes distinctes au point de vue structure quaternaire existant sous plusieurs formes polymériques.

A ces quatres groupes d'isoenzymes il faut en ajouter un cinquième qui peut ou non recouvrir les précédents dans lequel les isoenzymes diffèrent parce qu'elles ont été synthétisées par des gènes distincts.

Les méthodes d'électrophorèse, de chromatographie, les études cinétiques, la thermostabilité, les essais d'inhibition et surtout les réactions immunologiques ont fait énormément progresser nos connaissances dans le domaine des isoenzymes et ont permis ce début de classification.

L'immunoélectrophorèse apporte une aide précieuse dans cette différenciation : Si les protéines sont l'expression de gènes distincts les parentés structurales sont moins étroites et on ne retrouve pas de site antigénique commun.

La multiplication d'enzymes catalysant des réactions identiques permet un double perfectionnement :

- d'une part, elle permet la réalisation d'une commande indépendante de leur régulation

- d'autre part, elle permet la délocalisation d'opérations biochimiques semblables, à fonctions différentes et leur intégration dans des compartiments cellulaires distincts :

- soit organes différents
- soit cytoplasme et mitochondries

Il est même possible aujourd'hui d'envisager une spécialisation extrême, dans le même compartiment cellulaire, les formes entrant préférentiellement dans des complexes multi-enzymatiques distincts ou également dans des complexes enzymes-hormones différents.

Le sens de ces multiplications d'enzymes isofonctionnelles est un perfectionnement dont il faut entrevoir le caractère évolutif, et, là encore, l'étude des parentés de structure permettra une réponse plus précise.

Nous avons tenté de contribuer à l'étude des enzymes isofonctionnelles avec la créatinephosphokinase (E.C. 2.7.3.2.)

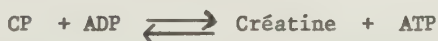
Cette enzyme fut découverte dans les extraits musculaires par LOHMANN (66) qui montra que la CPK catalysait le transfert du groupe-phosphate du créatinephosphate, selon la réaction :



Un an plus tard, LEHMANN (67) mettait en évidence la réversibilité de la réaction et montrait que l'accepteur de phosphate pouvait être soit ADP soit AMP.



Mais BANGA (68) utilisant une préparation enzymatique purifiée affirmait que les deux réactions étaient catalysées par deux enzymes différentes et que la créatinephosphokinase ne contrôlait que la première :



Après ces premiers travaux, différents auteurs se sont attachés à l'étude des propriétés et à la détermination de la structure de l'enzyme ainsi qu'à la mise au point de nombreuses méthodes de mesure de l'activité enzymatique en dosant l'un des quatre constituants de la réaction.

La connaissance de la structure de la CPK a permis de mettre en évidence l'existence de formes moléculaires multiples : la CPK serait en effet formée de deux monomères de type M ou B qui associés conduisent à trois isoenzymes :

- le dimère MM : présent dans les extraits musculaires
- le dimère BB : le plus souvent mis en évidence dans les homogénats d'encéphale
- le dimère MB : retrouvé dans le tissu cardiaque, associé à la première forme ou encore artificiellement reproduit par hybridation (69, 70)

Avant d'entreprendre l'étude de la CPK et plus particulièrement celle de ses enzymes isofonctionnelles, nous avons tout d'abord rassemblé dans un premier chapitre les données bibliographiques sur les CPK. Nous avons ensuite appliqué à la mesure de l'activité enzymatique, la méthode de dosage de la créatine définie dans la première partie de ce travail. Puis nous décrivons les deux procédés de séparation des formes moléculaires que nous avons mis au point, et qui nous ont permis d'aborder l'étude de quelques propriétés des CPK avec des préparations de l'une des isoenzymes non contaminée par une autre.

Nous avons également tenté d'apporter notre contribution à la connaissance des mécanismes de régulation de l'activité enzymatique et des interactions enzyme-hormone en vérifiant l'effet des ions et de l'insuline sur les deux dimères.

CHAPITRE VIII

DONNEES ACTUELLES SUR LES DIFFERENTES FORMES DE CREATINEPHOSPHOKINASE

Les travaux les plus nombreux ont porté sur la CPK musculaire : dès 1954, KUBY, NODA et LARDY (71, 72, 73) mettaient au point une méthode d'extraction de l'enzyme du muscle de lapin et déterminaient les propriétés de la CPK ainsi que les conditions de la réaction enzymatique. La même année, ENNOR et ROSENBERG (74) réalisaient une étude parallèle et mettaient en évidence l'importance des groupements thiol de l'enzyme.

L'étude de la CPK du cerveau, entreprise par NARAYANASWAMI (75), ne fut en fait reprise que beaucoup plus tardivement : en 1963 WOOD (76) publiait une méthode d'extraction de cette enzyme et déterminait ses propriétés qui furent précisées par DAWSON et coll. plus récemment (77).

Ces dernières années enfin, des études ont été réalisées avec les enzymes extraites d'autres organes (78)

Après avoir précisé la localisation, la répartition des isoenzymes, nous ferons le point des connaissances actuelles sur les propriétés et la structure des différentes CPK.

1 - Localisation

La CPK est présente dans les organes nécessitant une libération rapide d'énergie : muscle, coeur, et à un degré moindre encéphale. On en retrouve aussi de très faibles taux dans d'autres organes : rein, poumons, vessie, thyroïde.

Il est généralement admis que le foie et les érythrocytes ne contiennent pas d'enzyme bien que SOLVONUCK (37) d'une part, STEIN et LAMPRECHT (79) d'autre part, aient décelé la présence de CPK dans les homogénats de foie de rat et dans les hémolysats de globules rouges de lapin ou de rat.

Le sérum normal ne présente qu'une faible activité enzymatique ; toute augmentation du taux de CPK sérique sera le signe d'une lésion des organes riches en enzyme.

Le plus généralement, le muscle contient le dimère MM tandis que la forme BB se retrouve dans l'encéphale et l'hybride MB dans le coeur. Cependant la répartition des isoenzymes varie avec l'espèce : dans le coeur de poulet par exemple, l'enzyme de type BB a été isolée tandis que les trois isoenzymes ont été mises en évidence dans le coeur du rat.

Il nous faut préciser que chaque fois que nous parlerons de l'enzyme du cerveau, il s'agira du dimère BB tandis que lorsque nous citerons la CPK musculaire, il s'agira du dimère MM.

2 - Répartition cellulaire

La majeure partie de la CPK (80 à 97 %) est localisée dans le cytoplasme cellulaire (80, 81), mais une fraction est liée aux mitochondries.

Les observations de CHAPPELL (82) ont permis de localiser cette enzyme entre les membranes intra et extramitochondriales.

L'activité enzymatique des mitochondries varie avec l'organe et l'espèce envisagée : elle semble plus importante dans les mitochondries du cerveau (83, 84, 85) que dans celles du muscles ou du coeur (86, 87) ; les homogénats de tissu humain sont beaucoup moins riches que ceux du rat (88).

Le rôle de la CPK mitochondriale est encore discuté ; trois hypothèses ont été présentées : la CPK serait un intermédiaire entre les compartiments intra et extramitochondriaux dans les échanges de liaisons riches en énergie (88). Elle aurait un rôle de "feed-back" dans la respiration mitochondriale en réponse à l'activité musculaire (89). Elle permettrait la phosphorylation de la créatine tandis que l'enzyme cytoplasmique maintiendrait ATP dans les sites d'utilisation de l'énergie (90).

3 - Extraction

La principale source d'enzyme est le muscle de lapin ; c'est d'ailleurs la seule préparation qui ait été commercialisée. La CPK est extraite par homogénéisation à 0° dans l'eau distillée (91) ou dans des solutions de KCl (68,92,93), NaHCO₃ (94), saccharose 0,25 M (80). L'enzyme est précipitée soit par l'acétone à basse température en milieu

ionisé (95) soit par l'éthanol en présence d'ions Mg^{++} , Mn^{++} et Zn^{++} (92, 93) puis purifiée par cristallisation à -10° en présence de NH_4OH ou par chromatographie sur DEAE Cellulose (92, 93).

CHETVERIKOVA et coll. (96) viennent de signaler la mise au point d'une nouvelle méthode d'extraction permettant d'obtenir une préparation 3 à 5 fois plus riche qu'antérieurement.

La méthode de précipitation par l'éthanol est couramment appliquée à l'extraction de CPK d'autres organes sauf l'encéphale ; l'enzyme du cerveau est en effet plus labile ; elle est rapidement dénaturée par l'alcool. On l'extrait en remplaçant l'éthanol par l'acétone (76) ou par précipitation par $(NH_4)_2SO_4$ en présence d'un protecteur des groupements SH : le mercaptoéthanol (93).

4 - Poids moléculaire

ENNOR et ROSENBERG (74) d'une part, NODA et coll. (72) d'autre part, ont déterminé le poids moléculaire de l'enzyme musculaire : environ 80 000. Cette valeur a été confirmée avec les techniques nouvelles comme la filtration sur gel (77).

Les différentes formes de CPK possèdent le même poids moléculaire tandis que celui de l'enzyme traitée par l'urée 8 M ou le chlorhydrate de guanidine est voisin de 40 000 (97). Ceci est un argument supplémentaire pour une structure dimérique de l'enzyme.

5 - pH optimum

Le pH optimum pour la CPK musculaire varie avec le sens de la réaction contrôlée par cette enzyme (73, 74).

- 6,8 - 7,2 pour la réaction conduisant à la formation de créatine

- 9 - 10 si l'on considère la phosphorylation de la créatine par ATP

Avec l'enzyme extraite du cerveau de boeuf, le pH optimum de la première réaction est de 7,9 tandis que celui de la seconde reste inchangé (98).

6 - Influence des cations

L'activité enzymatique est régulée par des cations bivalents : parmi tous les cations testés, seul Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} permettent pour des concentrations bien définies, le développement de la réaction enzymatique

qui est pratiquement nulle en leur absence mais qui est inhibée par un excès de sels métalliques (73, 74).

Mg^{++} serait le cation le plus actif mais la nature du sel métallique intervient beaucoup moins que sa concentration (99).

Les taux les plus favorables varient avec le sens de la réaction : ils sont rapportés soit au taux d'azote ou d'enzyme (74) soit à la concentration d'ADP ou d'ATP (73)

Ces déterminations doivent tenir compte de l'anion introduit dans le milieu réactionnel car certains ont un effet inhibiteur qui peut masquer la véritable activité du cation (100)

Le cation stabilise la structure spatiale de l'enzyme. Il se combine au substrat en donnant un complexe qui représente en fait le véritable substrat (73, 100, 101).

RABIN et WATTS (102) suggèrent que dans la réaction conduisant à la formation de créatine phosphate, le métal oriente les groupements phosphate et neutralise partiellement certaines charges tandis que dans la réaction inverse, il assurerait le lien entre les groupements phosphate de ADP et du créatine phosphate.

On a comparé l'effet des cations sur les différentes formes moléculaires de CPK ; les résultats sont pratiquement identiques à ceux obtenus avec l'enzyme musculaire hormis un cas : la concentration optimale de Mg^{++} dans la réaction conduisant à la formation de créatine est pour l'enzyme du cerveau, moitié de celle définie pour la CPK musculaire (98).

7 - Cinétique de la réaction

L'étude de l'affinité de l'enzyme vis-à-vis des différents substrats montre que la CPK a plus d'affinité pour la créatine que pour le créatine phosphate (73). La réaction conduisant à la formation de créatine est donc plus rapide que la réaction inverse : ENNOR et ROSENBERG (74) ont montré qu'il suffisait de trois minutes pour libérer 50 % de la créatine du créatinephosphate alors que la phosphorylation d'un même taux de créatine en créatinephosphate demande 30 minutes.

L'affinité de la CPK vis-à-vis des substrats varie avec la forme moléculaire de l'enzyme : le dimère BB a moins d'affinité pour le créatinephosphate ou l'ADP que l'isoenzyme MM (93, 98) tandis que celle de l'hybride BM est intermédiaire.

8 - Stabilité de l'enzyme

La CPK est très instable. L'enzyme musculaire résiste 60 minutes à 30°, 20 minutes à 40° et seulement 5 minutes à 45°. L'augmentation de la température à 50° conduit à une inactivation rapide et irréversible. Par contre à 0°, la CPK est stable au moins 2 mois ; avec l'enzyme lyophilisée puis conservée à -10°, la baisse d'activité n'est que de 30 % après une année (73).

La CPK extraite du cerveau est encore plus thermolabile (77, 98). L'addition de protecteurs de groupements SH ne palie que partiellement à cet inconvénient. Cependant HOOTON (103) dans une récente publication, affirme que l'enzyme pure est stable plusieurs mois.

La stabilité de l'enzyme dépend de sa concentration (74), de la force ionique du milieu (73), du taux d'ADP ou d'ATP présent (73) ; par contre, elle est peu influencée par le pH.

L'instabilité de la CPK semble due à l'oxydation des groupements SH de l'enzyme (104) ou à leur inactivation par un inhibiteur (94).

9 - Spécificité

La spécificité de l'enzyme est étroite : aucun dérivé guanidique en peut être substitué à la créatine (92).

Le remplacement de ADP ou ATP par d'autres polyphosphates de nucléotides conduit à des réactions très lentes (92, 99), bien que NIHEI et coll. (105) affirment que la vitesse de la réaction ne soit pas modifiée en présence de ITP ou CTP.

BANGA (68) avec d'autres auteurs (36, 74, 106) ont montré d'autre part qu'AMP ne pouvait en aucun cas remplacer ADP ou ATP.

10 - Activateurs

Les composés à groupement thiol sont susceptibles d'activer la CPK.

En 1954, ENNOR et ROSENBERG (74) montraient que la cystéine augmentait et régularisait l'activité enzymatique. Cet effet ne fut, au départ, observé que pour la réaction conduisant à la créatine. Depuis il a également été mis en évidence pour la réaction inverse (104).

D'autres composés peuvent remplacer la cystéine ; ce sont des dérivés possédant une fonction SH : le glutathion réduit (104), le mercaptoéthanol (53), le dithiotreitol (107).

L'effet de ces composés est identique quelle que soit l'isoenzyme considérée. Ils agissent en réactivant les groupements SH de l'enzyme dont l'intégrité conditionne l'activité de la CPK.

Il est cependant quelques cas où les composés à groupement SH restent inactifs : ROTTHAUWE et KOWALEWSKI (104) supposent que l'effet de la cystéine serait alors masqué par la présence dans les broyats musculaires, d'un inhibiteur.

L'activité de la CPK semble être augmentée également en présence d'insuline. Cet effet observé par CONN (108) puis HANOUNE et SCHAPIRA (109) uniquement sur l'enzyme musculaire est controversé ; il met en cause les relations enzymes-hormones et nous tenterons à la fin de notre travail, d'apporter notre contribution à cette étude.

11 - Inhibiteurs

Certains composés inhibent l'enzyme parce qu'ils complexent le métal nécessaire à son activité. C'est le cas des phosphates, du citrate, du fluorure, de l'EDTA, de l'acide malonique (73, 74).

- D'autres dérivés modifient l'activité de la CPK en dépolymérisant l'enzyme : l'urée 8 M et chlorhydrate de guanidine dissocient les dimères en monomères inactifs. L'inhibition est généralement levée par dilution ou dialyse. Le pouvoir dépolymérisant de l'urée ou du chlorhydrate de guanidine a été utilisé pour obtenir artificiellement un hybride MB à partir des deux enzymes MM et BB (69).

- Un autre composé : la thyroxine inhibe la CPK mais le mécanisme de cette inhibition est encore mal connu ; deux hypothèses sont présentées : formation de complexes avec Mg^{++} (73) ou adsorption à la surface de la molécule avec dénaturation (110).

- L'inhibition de la réaction enzymatique peut être provoquée par des composés de structure voisine de celle du substrat et qui entrent en compétition avec ce dernier pour les sites catalytiques de l'enzyme (73). Ainsi ADP inhibe la phosphorylation de la créatine parce qu'il entre en compétition avec ATP.

- Un dernier groupe de composés modifie l'activité de la CPK : ce sont des dérivés connus pour agir sur les fonctions SH en particulier l'iodacétate et la para-chloromercuribenzoate de sodium. L'étude de leur effet a permis d'élucider la structure de la CPK ; c'est pourquoi nous résumerons les travaux consacrés à ces composés dans la mise au point sur la structure de la CPK.

12 - Structure de l'enzyme

La structure primaire de la CPK, c'est-à-dire le nombre et

l'enchaînement des acides aminés constitutifs de la protéine, est connue depuis longtemps.

Elle a été déterminée par les méthodes habituelles :

- hydrolyse enzymatique avec la pepsine (111) ou la trypsine (112) pour remplacer l'hydrolyse acide (113) ou alcaline (114), premières méthodes mises en oeuvre.

- hydrolyse ménagée avec la leucineaminopeptidase ou la carboxypeptidase A (115)

- analyse des produits de dégradation par chromatographie (papier, échange d'ions), électrophorèse (haute et basse tension) ou chromatographie électrophorèse.

- dosage direct de certains acides aminés constitutifs (116,117)

- marquage d'une fraction de l'enzyme, ici les groupements SH actifs, au dinitrofluorobenzène (111) ou à l'iodoacétate radioactif (115).

Parmi les acides aminés constitutifs de la CPK musculaire, on a isolé 8 molécules de tryptophane, 8 de cystéine et 33 d'histidine (114).

Les acides aminés basiques prédominent ; on retrouve par contre peu d'acides aminés soufrés. La présence de tryptophane différencie la CPK d'une autre enzyme de structure très voisine, la myokinase.

L'isoenzyme de type BB contient le même nombre de molécules de tyrosine et de tryptophane (98) mais est par contre, moins riche en acides aminés basiques (93). L'hybride MB présente une composition intermédiaire (93).

EPPEMBERGER et coll. (93) étudiant la structure des différentes formes de CPK ont montré que les variations étaient faibles entre les enzymes de même organe mais d'espèce différente tandis qu'elles sont plus marquées dans une même espèce entre l'enzyme musculaire et celle du cerveau.

Les observations de DANCE et WATTS (112) confirment celles d'EPPEMBERGER et coll. (93) puisque deux peptides seulement différencient la CPK musculaire du Lièvre de celle du Lapin.

La structure des sites actifs de la CPK a été en partie élucidée avec l'étude de l'effet inhibiteur de composés tels que l'iodacétate ou le para-chloromercuribenzoate de sodium. Ces dérivés inhibent la CPK en se fixant sur les groupements SH du site actif. Les variations de l'activité enzymatique en fonction de la concentration d'iodacétate indiquent que la CPK musculaire possède deux groupements SH actifs (118, 119, 120) ; mais le nombre total des groupements thiol de la molécule est plus important : on en a dénombré 6 par titrage ampérométrique (121) ou après dénaturation par l'urée (122).

Si la plupart des CPK étudiées possèdent 2 groupements SH actifs, par contre on n'en a retrouvé qu'un seul dans la CPK du cerveau de poulet (77) et dans l'enzyme extraite d'un muscle dystrophique (123).

Les deux groupements actifs peuvent se trouver dans un seul site ou au contraire, l'enzyme peut présenter deux sites actifs comprenant chacun un groupement SH. Il semble, à la lumière des travaux de MAHOWALD (111) que la deuxième hypothèse soit la plus plausible.

L'environnement des deux groupements thiol est connu : THOMSON et coll. (115) d'une part, MAHOWALD (111) d'autre part ont déterminé la séquence des amino-acides proches : elle est identique pour les deux fractions.

C'est par l'intermédiaire des groupements SH que le substrat se fixerait sur l'enzyme au niveau du site actif : on a pu, en effet, mettre en évidence le pouvoir protecteur des substrats, contre l'effet inhibiteur de l'iodacétate (119).

Cependant pour WATTS (124), les groupements SH ne participeraient pas à la réaction proprement dite, mais ils maintiendraient le niveau de charge, le degré d'ionisation et la géométrie du site actif.

L'étude des groupements thiol a été conduite le plus souvent avec l'iodacétate de sodium, mais les conclusions sont identiques si l'on remplace l'iodacétate par l'acétate de para-nitrophénol (125), l'acide dithio-5,5', bis (2 nitrobenzoïque) (réactif d'ELLMANN (122) ou l'iodométhane (103).

Par contre avec le para-hydroxymercuribenzoate de sodium, 4 groupements SH semblent nécessaires à l'activité enzymatique ; les substrats ne protègent pas l'enzyme de l'inactivation qui est réversible et peut être levée par dilution.

Il est généralement admis que la CPK est un dimère formé de deux chaînes identiques possédant chacune un site actif avec un groupement SH. La nature des liens entre les deux chaînes est encore inconnue : l'hypothèse de ponts S-S avait été avancée (114) mais elle a été rejetée par d'autres auteurs (115, 126) sans que ces derniers puissent préciser la nature des liens.

Les deux unités ne sont probablement pas linéaires : si l'on admet avec RABIN et WATTS (102) que les fonctions SH sont reliées par des liaisons hydrogène au groupement imidazole de la protéine, l'histidine doit être adjacente au groupe thiol : connaissant l'enchaînement des acides aminés, ceci n'est possible qu'avec des "replis" de la molécule dans l'espace.

Ces données rapidement résumées montrent que les mécanismes de régulation de l'activité enzymatique restent encore obscurs. En vérifiant l'effet des ions et de l'insuline sur les fractions purifiées de CPK, obtenues après chromatographie sur DEAE Cellulose, nous tenterons d'apporter notre contribution à cette étude.

CHAPITRE IX

MESURE GLOBALE DE L'ACTIVITE DE LA CREATINEPHOSPHOKINASE SERIQUE

L'activité CPK du sérum normal est faible ; toute augmentation est le signe d'une nécrose des organes riches en enzyme en particulier les muscles, le coeur et l'encéphale.

Le taux de CPK est mesuré en dosant l'un des quatre constituants mis en jeu dans la réaction contrôlée par l'enzyme : créatinephosphate, ADP, ATP ou créatine.

Ayant défini dans la première partie de ce travail, une méthode de dosage de la créatine, nous l'avons appliquée à une méthode manuelle de mesure de la CPK sérique et à l'analyse en flux continu.

A - METHODES EXISTANTES

Les méthodes proposées utilisent les deux sens de la réaction contrôlée par la CPK et dosent l'un des quatre composants (tableau 35).

On peut les diviser en deux groupes :

- mesure directe des composés formés : créatinephosphate, créatine.

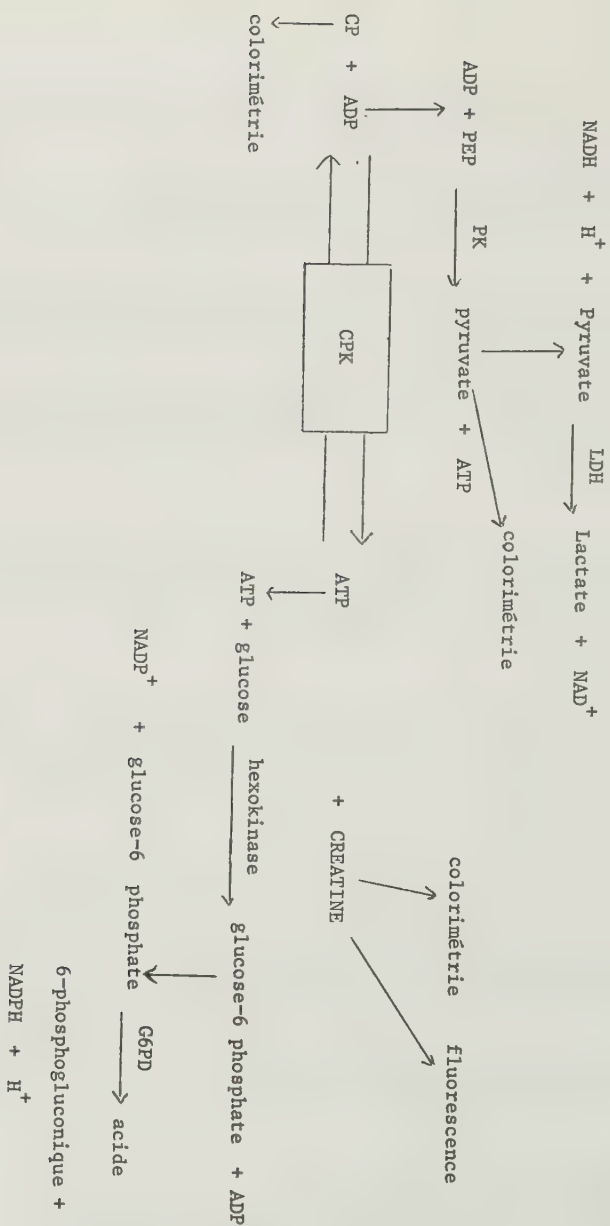
- mesure indirecte de ADP ou ATP en couplant la réaction primitive avec des réactions auxiliaires puis estimation dans une étape finale des variations de densité optique à 340 nm.

Dans le premier groupe, on peut également inclure des méthodes titrimétriques plus rarement utilisées, qui dosent H^+ apparu au cours de la phosphorylation de la créatine (119, 127).

1) Dosage du créatinephosphate

On dose avec le molybdate d'ammonium le phosphore libéré par hydrolyse acide du créatinephosphate, apparu ou résiduel.

Tableau 35 : Principales méthodes de dosage de la créatinephosphokinase



Ces méthodes utilisées d'abord pour l'estimation de la CPK dans les tissus (71, 75) furent ensuite appliquées à la mesure de la CPK sérique (128, 129). Elles ne sont plus très employées en raison de leur manque de spécificité : le phosphore dosé ne provient pas uniquement de l'hydrolyse du créatinephosphate. Par contre elles mettent en oeuvre des réactifs peu coûteux et faciles à obtenir.

2) Dosage de ADP

On associe dans ces techniques la CPK avec la pyruvate-kinase et la deshydrogénase lactique. La réaction globale montre que la phosphorylation de la créatine s'accompagne d'une transformation quantitative de NADH en NAD^+ . On mesure à 340 nm les variations de densité optique dues à la disparition de NADH.

Initialement mise au point par TANZER et GILVARG (130), cette méthode a été souvent modifiée (131, 132, 133, 134, 135, 136, 137).

Sa spécificité n'est pas sans défaut et il peut y avoir interférence de :

- la phosphatase alcaline qui transforme le phosphoénolpyruvate en pyruvate
- l'ATP-ase qui hydrolyse ATP en ADP et H_3PO_4
- la myokinase qui transforme ATP en ADP en présence d'AMP
- la glycocyamine par formation de glycocyaminephosphate.

Un témoin réactif mesure l'intensité des réactions parasites et palie au manque de spécificité.

Dans ce groupe, il nous faut signaler la méthode colorimétrique de NUTTAL et WEDIN (138) qui couple la CPK avec la pyruvatekinase seule. Le pyruvate formé est dosé colorimétriquement par formation d'hydrazone avec la dinitro-2,4 phénylhydrazine.

Nous devons enfin noter que KIBRICK et MILHORAT (139) ont utilisé ce procédé pour doser la créatine sérique avec la CPK comme réactif.

3) Dosage de ATP

ATP formé au cours de la réaction est utilisé selon le procédé de KORNBERG (140) en présence d'héxokinase et de glucose-6 phosphate déshydrogénase.

On mesure à 340 nm les variations de densité optique dues à la diminution de NADP^+ et qui sont proportionnelles au taux de CPK.

Les conditions du dosage définies par OLIVER (141) pour doser la CPK des tissus, ont été adaptées à la mesure de l'activité sérique (79, 142) ; elles ont permis à HESS et coll. (143) puis à ROSALKI (107) de mettre au point une technique où tous les substrats sont incorporés dans des capsules de gélatine prêtes à l'emploi.

Le procédé de KORNBERG a été également utilisé en histologie pour localiser la CPK dans les coupes musculaires. (144).

Ces techniques manquent de spécificité puisqu'elles sont susceptibles de doser également la myokinase et l'ATP-ase. Pour éviter l'interférence de la myokinase, il est nécessaire d'introduire un excès d'AMP dans le milieu (141, 145) ; cependant ce procédé est parfois critiqué car il peut partiellement inhiber la CPK (142).

4) Dosage de la créatine

La créatine libérée est dosée :

- soit par colorimétrie avec le dioxo-2,3 butane
- soit par fluorescence avec la ninhydrine.

a) Colorimétrie avec le dioxo-2,3 butane

Reprenant le protocole opératoire d'EGGLETON et coll. (11), ENNOR et ROSENBERG (74) ont défini une méthode de mesure de l'activité créatinephosphokinase.

Leur technique fut souvent reprise. Les variations apportées, résumées dans le tableau 36 portent sur :

- la concentration des substrats
- le pH de la réaction
- le choix des composés à groupements SH et le procédé utilisé pour leur élimination
- la température et le temps de développement de la réaction enzymatique
- la défécation
- le volume de la prise d'essai

TABLEAU 36 : Principales méthodes de dosage de la créatinephosphokinase, mesurant la créatine libérée

	Tampon	pH	Addition de composés SH	Température de développement de la réaction	Arrêt de la réaction enzymatique et déprotéinisation	Concentration en μM		Prise d'essai
						CP	ADP	
CHAPPEL et PERRY (36) 1954	TRIS + Mg SO_4	7,4	cystéine	5 mn à 30°	phénylacétate de mercure $\text{Ba (OH)}_2 + \text{Zn SO}_4$	2,5	2,5	
ENNR et ROSENBERG (74) 1954	TRIS + Mg SO_4	7,2	cystéine	37°	$\text{CCl}_3 - \text{COOH}$	0,3	0,3	0,2 ml
ROSENBERG et ENNR (146) 1955	TRIS + Mg SO_4	7,2	cystéine	2 mn à 37°	p-chloromercuribenzoate $\text{Na (OH)} + \text{versenate}$	0,25	0,25	0,2 ml
SOLVONUK (37) 1956	TRIS + Mg SO_4	6,8	-	60 mn à 37°	phénylacétate de mercure $\text{Ba (OH)}_2 + \text{Zn SO}_4$	5	6	0,1 ml
DREYFUS et SCHAPIRA (38) 1961	TRIS + Mg Cl_2	7,2	-	30 mn à 37°	$\text{Ba (OH)}_2 + \text{Zn SO}_4$	0,75	3	0,1 ml
MORRISON et coll. (101) 1961	N-éthyl- morpho- line	8	-	30°	$\text{NaOH} + \text{EDTA}$	10	-	0,02 ml
HUGHES (40) 1962	TRIS + Mg SO_4	7,4	cystéine	30 mn à 37°	p-chloromercuribenzoate $\text{Ba (OH)}_2 + \text{Zn SO}_4$	3,5	1,2	0,1 ml
KIRK (147) 1962	TRIS + Mg Cl_2	6,8	-	10 - 20 mn à 38°	phénylacétate de mercure $\text{Ba (OH)}_2 + \text{Zn SO}_4$	4,35	3,5	2 ml
ROZBERG (39) 1962	TRIS + Mg Cl_2	7,2	-	30 mn à 37°	$\text{Ba (OH)}_2 + \text{Zn SO}_4$	0,75	1,5	0,1 ml
NICHOL (41) 1964	TRIS + Mg SO_4	7,2	glutathion	10 mn à 37°	$\text{Ba (OH)}_2 + \text{Zn SO}_4$	4,5	3,6	0,1 ml
SCHAPIRA et DREYFUS (148) 1964	TRIS + Mg Cl_2	7,2	cysteine	30 mn à 37°	p-chloromercuribenzoate $\text{Ba (OH)}_2 + \text{Zn SO}_4$	1,5	3	0,1 ml ou 0,01 ml
SAX et MOORE (50) 1965	imidazole + acétate de Mg	6,8	mercapto- éthanol	10 mn à 25°	$\text{Ba (OH)}_2 + \text{Zn SO}_4$	2,8	2	0,1 ml
CONN et ANIDO (51) 1966	TRIS + acétate de Mg	6,8	cysteine	10 mn à 37°	$\text{EDTA} - \text{Ba (OH)}_2 + \text{Zn SO}_4$	20	20	0,1 ml
SIEGEL et COHEN (42) 1966	imidazole + Mg SO_4	6,8	mercapto- éthanol	10 mn à 37°	N - éthyl-maléimide malonate de sodium et dialyse	5,1/mn	2,8/mn	0,16 ml/mn
FLEISHER (43) 1967	triéthanol- amine + Mg Cl_2	7	cysteine	7,7 mn à 37,5°	phénylborate de mercure dialyse	5,1/mn	1,5/mn	0,32 ml/mn
MENACHE et GAIST (44) 1967	TRIS + Mg Cl_2	7,2	cysteine	30 mn à 37°	$\text{EDTA} - \text{Ag NO}_3$	2	2,4	0,02 ml
WILLIS-NOSAL et KING (52) 1967	TRIS + acétate de Mg	7,2	cysteine	37°	$\text{EDTA} - \text{dialyse}$	3/mn	3,8/mn	0,10 ml/mn
STERBA et DURAFFOURD (45) 1968	TRIS + Mg SO_4	7,2	cysteine	10 mn à 37°	phénylacétate de mer- cure	0,5	0,2	0,1 ml

b) Fluorescence en présence de ninhydrine

En se basant sur la réaction à la ninhydrine de CONN (35), SAX et MOORE (50) ont mis au point un dosage fluorimétrique de la CPK qui fut ensuite légèrement modifié par CONN et ANIDO (51).

La mesure de la CPK par dosage de la créatine libérée est beaucoup plus spécifique : seuls peuvent interférer les dérivés guanidiques du sérum ; or avec une faible prise d'essai, ils ne représentent qu'une petite fraction par rapport à la quantité de créatine libérée et certains, comme l'arginine sont éliminés au cours de la déprotéinisation.

C'est donc une méthode de ce type que nous avons préconisée et que nous utilisons.

B - MISE AU POINT D'UNE METHODE MANUELLE DE MESURE DE LA CPK

Nous avons repris l'étude des principales variations apportées à la méthode originale d'ENNOR et ROSENBERG (74).

La réaction enzymatique est développée selon les conditions de SAX et MOORE (50) mais nous dosons colorimétriquement la créatine libérée par le dioxo-2,3 butane et l'orcinol selon le protocole opératoire défini dans la première partie de ce travail.

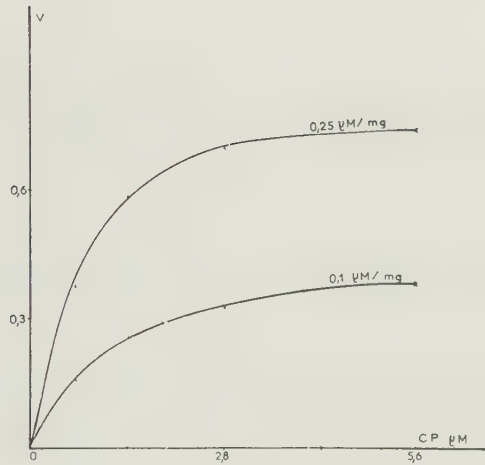
I - Concentrations des substrats

Les concentrations de créatinephosphate et d'ADP utilisées sont très variables (tableau 36). De plus CHAPPELL et PERRY (36) puis HUGHES (40) ont signalé qu'ADP en excès inhibait la réaction alors que cet effet n'a pas été retrouvé par CONN et ANIDO (51).

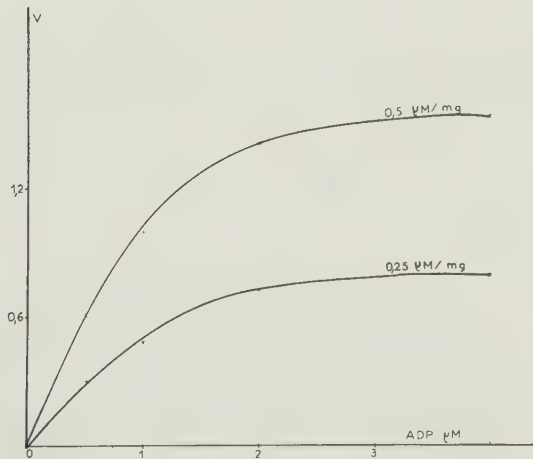
Nous avons donc réétudié l'influence de la concentration en créatinephosphate et en ADP sur la réaction (graphiques 24 et 25). On remarque que :

- Au delà d'une certaine concentration, la quantité de créatine libérée n'augmente plus proportionnellement au taux des substrats mais nous n'avons pas retrouvé l'effet inhibiteur de ADP en excès.

- 2 et 2,8 micromoles représentent respectivement les concentrations optimales de ADP et de créatinephosphate.



Graphique 24 Cinétique de la CPK pour le créatine-phosphate selon HENRI et MICHAELIS. (V = vitesse de la réaction exprimée en micromoles de la créatine libérées).



Graphique 25 Cinétique de la CPK pour ADP selon HENRI et MICHAELIS. (V = vitesse de la réaction exprimée en micromoles de créatine libérées).

Nous avons également déterminé la cinétique de la CPK pour le créatinephosphate et l'ADP. Les constantes de MICHAELIS, exprimées en Mole/litre et déduites de la représentation de LINEWEAVER-BURK sont respectivement :

pour le dimère MM :	$1,9 \times 10^{-3}$	pour le créatinephosphate
	9×10^{-4}	pour ADP
pour le dimère BB :	7×10^{-3}	pour le créatinephosphate
	8×10^{-4}	pour ADP

Les valeurs trouvées pour ADP sont proches de celles citées dans la littérature tandis que celles pour le créatinephosphate diffèrent plus nettement.

Les essais ont été effectués avec les enzymes extraites de broyats d'organe. Le manque de purification de l'enzyme et l'instabilité de la CPK dans ces conditions pourraient être à l'origine des variations observées.

2 - pH de la réaction

Le pH optimum est voisin de 7. Le choix du tampon est limité puisque d'après la littérature les chlorures et les sulfates inhibent la CPK (100) tandis que les tampons à base de glycine et de glycyl-glycine interfèrent dans la réaction colorée finale. De plus, le milieu réactionnel doit contenir des ions Mg^{++} pour favoriser l'activité enzymatique.

Nous avons choisi le tampon préconisé par SAX et MOORE (50) à base d'imidazole et d'acétate de magnésium (pH = 6,8)

3 - Choix des composés à groupement thiol

L'étude bibliographique des propriétés de la CPK a mis en évidence le pouvoir activateur des composés à groupement SH qui protègent de l'oxydation les groupements thiols de l'enzyme. Ils augmentent la sensibilité et la reproductibilité de la réaction (149) mais leur effet serait différent sur la CPK sérique et sur celle des homogénats d'organes : pour OKINAKA et coll. (94), ces dérivés neutraliseraient un inhibiteur présent dans le sérum.

Les principales substances utilisées sont le glutathion, la cystéine et le mercaptoéthanol. Mais un nouveau dérivé a été récemment préconisé : le dithiothreitol (107).

Ces produits sont généralement introduits dans le milieu réactionnel mais NICHOL (150) préfère ajouter du glutathion dans le sérum au moment du prélèvement.

Cependant les composés à groupement thiol, nécessaires à l'activité enzymatique présentent l'inconvénient d'inhiber la réaction colorée finale. Il faudra donc les éliminer avant de doser la créatine.

Dans la première partie de ce travail, nous avons contrôlé l'effet inhibiteur des composés SH sur la réaction colorée développée en présence d'alpha-naphtol. Nous avons repris cette étude avec l'orcinol (tableau 37) dans les conditions adoptées pour le dosage de la créatine.

Tableau 37 : Effet des composés SH sur la réaction créatine-dioxo-2,3 butane - orcinol (créatine 200 nM).
(Résultats exprimés en D.O.)

Composés SH (micromoles)	0	0,5	5	50
Cystéine	0,95	0,69	0,36	0,17
Dithiothreitol	0,95	0,76	0,33	0,03
Glutathion	0,95	0,60	0,26	0,14
Mercaptoéthanol	0,95	0,64	0,26	0,15

- On retrouve une action inhibitrice mais elle est un peu plus faible qu'avec l'alpha-naphtol.

- Le glutathion et le mercaptoéthanol présentent un même effet inhibiteur. Celui de la cystéine est un peu moindre.

La cystéine et le glutathion étant des composés instables dont l'activité varie avec les lots de réactifs (41) et le dithiothreitol un produit onéreux, nous avons adopté le mercaptoéthanol relativement plus stable (138). Nous l'introduisons dans le milieu à la concentration choisie par SAX et MOORE (50) : 5 micromoles.

Plusieurs composés ont été proposés pour éliminer avant la réaction colorée finale les produits à groupement thiol : le chloro-4 mercuribenzoate de sodium (40, 146, 148), le phénylacétate de mercure (36, 45, 147), le phénylborate de mercure (43) et le N-éthylmaléimide (42).

Ces substances introduites dans le milieu après le développement de la réaction enzymatique, lèvent l'effet inhibiteur des composés SH et permettent en même temps son arrêt puisqu'ils bloquent aussi les groupements SH de la CPK.

Le chloro-4 mercuribenzoate de sodium est le dérivé le plus fréquemment utilisé : c'est celui que nous avons adopté.

Nous avons contrôlé l'effet de ce produit en fonction de sa concentration (tableau 38). La réaction enzymatique développée en présence de 5 micromoles de mercaptoéthanol, est arrêtée par des taux croissants de chloro-4 mercuribenzoate de sodium et par déprotéinisation.

- On constate d'après les résultats rassemblés dans le tableau 38 que sans chloro-4 mercuribenzoate de sodium, la coloration est faible tandis qu'elle s'intensifie si l'on introduit ce composé dans le milieu.

9 micromoles suffisent à lever l'effet inhibiteur du mercaptoéthanol. A une concentration supérieure à 30 micromoles, le chloro-4 mercuribenzoate de sodium inhibe lui-même la réaction colorée.

Tableau 38 : Dosage de la CPK : influence du chloro-4 mercuribenzoate de sodium.

Chloro-4 mercuribenzoate de sodium (micromoles)	0	3	6	9	15	30	60
Micromoles de créatine libérées	0,21	0,31	0,32	0,32	0,31	0,31	0,27

4 - Arrêt de la réaction enzymatique

Le premier déféquant utilisé fut l'acide trichloracétique (74). Ce réactif n'a pas été repris car il provoque l'hydrolyse du créatine-phosphate.

Actuellement la défécation la plus couramment employée est la défécation barytique bien que CHAPPELL et PERRY (36) comme STERBA et DURAFFOURD (45) affirment qu'elle ne stoppe pas entièrement l'activité enzymatique. Ces auteurs inactivent l'enzyme par addition supplémentaire de phénylacétate de mercure.

Cependant cette hypothèse est niée par SAX et MOORE (50) comme par CONN et ANIDO (51), qui n'ont pu mettre en évidence une activité résiduelle après la déprotéinisation.

Pour notre part, nous utilisons la défécation barytique après avoir inactivé la CPK par addition de chloro-4 mercuribenzoate de sodium.

5 - Température - Temps d'incubation

La réaction enzymatique est développée à 25 - 30 ou 37° et le temps d'incubation varie de 5 à 60 minutes (tableau 36).

DREYFUS et SCHAPIRA (38) puis CONN et ANIDO (51) ont montré que l'activité enzymatique était plus importante à 37° mais qu'il ne fallait cependant pas dépasser cette température en raison de la grande labilité de la créatinephosphokinase.

L'étude comparative de la réaction développée à 37° et à 25°C, résumée dans le tableau 39, confirmant ces résultats, nous opérons à 37°.

Tableau 39 : Intensité de la réaction enzymatique en fonction du temps d'incubation et de la température (résultats exprimés en micromoles de créatine libérées).

Temps d'incubation (minutes)	5	10	30	60
25°	0,3	0,6	1,08	1,14
37°	0,72	0,96	1,26	1,32

DREYFUS et SCHAPIRA (38) puis CONN et ANIDO (51) ont montré que le taux de créatine libéré était proportionnel au temps d'incubation pendant 30 minutes. Cependant la réaction n'est linéaire que pour de faibles concentrations de CPK et il est absolument nécessaire de diluer les sérums présentant une activité enzymatique élevée (38, 151).

Nous avons obtenu des résultats analogues avec les conditions que nous avons choisies (graphique 26).

Il n'est donc pas utile de prolonger le temps d'incubation ; la sensibilité de la réaction créatine-dioxy-2,3 butane - orcinol mise en oeuvre permet de réduire le temps à 10 minutes, puisque dans ces conditions le taux de créatine libéré est suffisamment important pour être mesurable même avec des sérums normaux.

6 - Volume de la prise d'essai

Il est habituellement de 0,1 ml mais a été réduit à 20 microlitres en microméthode. NUTTAL et WEDIN (138) ayant signalé que l'on ne devait pas utiliser une prise d'essai supérieure à 0,1 ml parce que le sérum contiendrait un inhibiteur de la CPK, nous utilisons une prise d'essai de 0,1 ml.

Conclusions

Nous avons retenu les conditions suivantes pour la mesure de l'activité enzymatique :

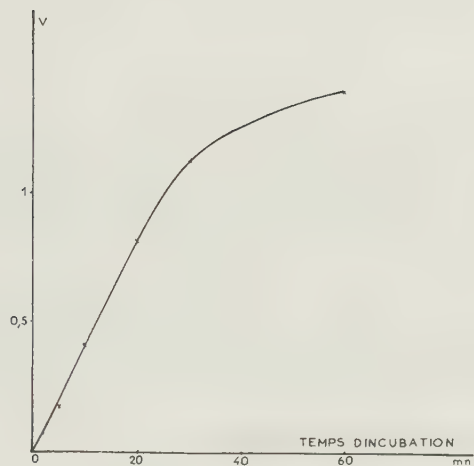
- la réaction est développée 10 minutes à 37° dans un milieu tampon imidazole-acétate de magnésium (pH = 6,8) en présence de 2,8 micromoles de créatine-phosphate, 2 micromoles d'ADP et de 5 micromoles de mercaptoéthanol.

- La prise d'essai est de 0,1 ml de sérum.

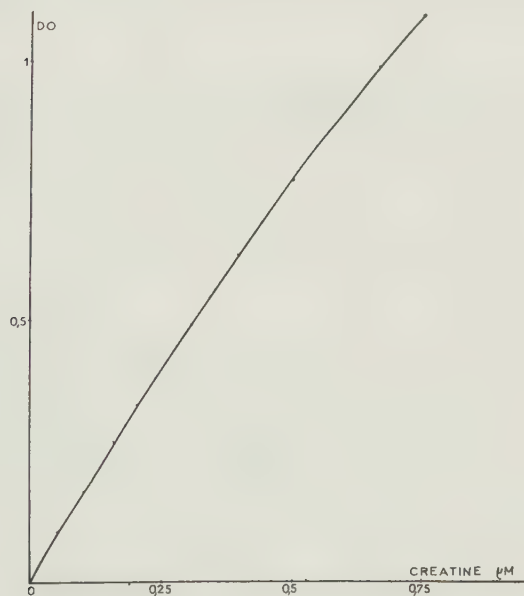
- l'activité enzymatique est arrêtée par addition de chloro-4 mercuribenzoate (9 micromoles) et les protéines sont éliminées par défécation barytique. La créatine libérée est dosée dans le surnageant par le dioxy-2,3 butane en milieu alcalin, en présence d'orcinol et de glucuronolactone.

- Le détail des réactifs est exposé dans l'annexe à la fin de notre travail.

Les résultats sont exprimés en micromoles de créatine libérées par ml et par heure. L'étalonnage est réalisé avec des solutions de créatine (graphique 27).



Graphique 26 Mesure de l'activité de la CPK : choix du temps d'incubation. (V = vitesse de la réaction exprimée en micromoles de créatine libérées).



Graphique 27 Mesure de l'activité de la CPK : gamme d'étalonnage (Spectrophotomètre Safas 520 nm).

C - ADAPTATION A L'ANALYSE EN FLUX CONTINU

A notre connaissance, trois méthodes automatiques de mesure de la CPK basées sur le dosage de la créatine, ont été décrites : colorimétrie avec le dioxo-2,3 butane et l'alpha-naphtol (42, 43) ou fluorimétrie avec la ninhydrine (52).

En prenant pour base, d'une part la technique de dosage automatique de la créatine définie dans la première partie de notre travail et d'autre part les conditions de mesure de l'activité enzymatique précédemment décrites en méthode manuelle, nous avons mis au point le dosage de la CPK en flux continu.

a) Conditions de l'analyse

Le réactif substrat est un mélange extemporané des solutions de créatinephosphate, d'ADP et de mercaptoéthanol employées en méthode manuelle. Les concentrations respectives exprimées en micromoles pompées par minute, sont de 5,7 micromoles de créatinephosphate, 4,4 d'ADP et 9,6 de mercaptoéthanol. L'hydrolyse spontanée du créatinephosphate rend nécessaire le maintien du mélange dans un bain de glace.

Tableau 40 : Intensité de la réaction en fonction de la concentration en créatinephosphate et ADP.
(résultats en micromoles de créatine libérées)

Réactif - Substrat (micromoles/minute)		Echantillon 1 (0,1 micromoles de créa- tine/mg de protéines)	Echantillon 2 (0,2 micromoles de créatine/mg de protéines)
CP	ADP		
1,42	4,4	0,6	1,25
2,85	4,4	0,85	1,8
5,7	4,4	0,83	2,10
5,7	2,2	0,75	1,84
5,7	1,1	0,63	1,7

En nous reportant aux concentrations rapportées par différents auteurs et en raison du coût élevé du créatinephosphate, et dans une moindre mesure de l'ADP, nous avons tenté de limiter la concentration de ces réactifs. Mais les essais réalisés à partir d'échantillons d'activité enzymatique très augmentée (résumés dans le tableau 40) démontrent qu'il est hasardeux d'utiliser des concentrations inférieures à celles indiquées plus haut, la libération de créatine ne demeurant plus proportionnelle à l'activité enzymatique.

L'hydrolyse du créatinephosphate est effectuée à 37°. Dans les conditions décrites, la durée d'incubation est de 12 minutes.

La réaction enzymatique est stoppée par dialyse et aussi par addition avant l'entrée du dialyseur de chloro-4 mercuribenzoate de sodium.

La créatine libérée est ensuite dosée comme il a été décrit précédemment.

b) Diagramme des flux

Les conditions du dosage sont résumées dans le schéma ci-après.

Les colorations sont lues en cuve tubulaire de 15 mm à 520 nm. La vitesse de rotation du porte-échantillon est de 60 prélèvements par heure avec un godet d'eau entre chaque dosage destiné à diminuer les risques de contamination.

Les résultats sont exprimés en micromoles de créatine libérées.

c) Etalonnage

L'étalonnage est réalisé avec des solutions de créatine de concentrations variant de 0,0001 M à 0,004 M.

Le graphique 28 représentant un tracé d'étalonnage met en évidence la grande sensibilité de la méthode. Dans les conditions décrites, moins de 0,1 micromoles/ml de créatine sont décelées.

Le graphique 28 montre également la bonne reproductibilité de la technique.

Conclusions

Nous avons défini les conditions d'un dosage de la CPK en flux continu. Ces conditions très proches de celles décrites en méthode manuelle, conduisent à une méthode de dosage très sensible.

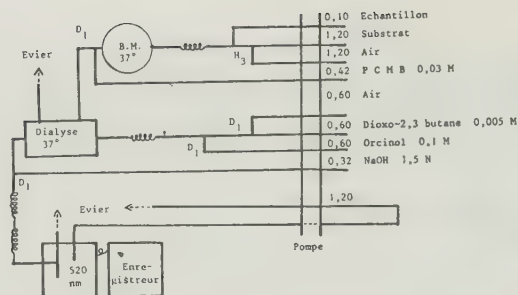
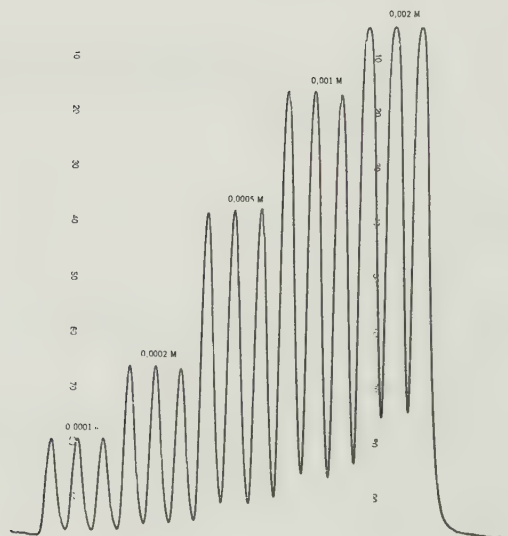


Schéma Mesure de l'activité de la CPK en flux continu :
Diagramme des flux.



Graphique 28 Dosage automatique de la créatine phospho-
kinase : Etalonnage et essais de reproductibilité.

D - DISCUSSION DES METHODES DE DOSAGE

1 - Sensibilité de la réaction

L'activité enzymatique de sérums normaux a été mesurée dans les conditions précédemment définies et selon la méthode fluorimétrique de SAX et MOORE (50) légèrement modifiée en opérant à 37° au lieu de 25°.

Les résultats de 60 mesures sont rassemblés dans le tableau 41.

Tableau 41 : Dosage de la CPK - Comparaison avec la méthode fluorimétrique de SAX et MOORE.
(résultats en micromoles de créatine libérées par ml et par heure).

Colorimétrie	Fluorescence	Colorimétrie	Fluorescence	Colorimétrie	Fluorescence
6	4,5	5,1	6,2	3,9	3,3
4,2	3	4,5	3,5	2,1	1,4
3	1,9	3	2,4	2,4	2,4
8,4	6,7	1,5	1,8	3,6	2,7
1,5	1,1	5,1	4,8	1,8	1,6
1,5	2,1	3,6	3,4	2,4	1,6
7,8	6,1	6	1,8	3,6	3
3	2	5,1	3,9	2,4	1,9
2,5	2,2	2,7	3	2,4	2,3
6	5,7	3	2,4	7,2	7,7
2,4	2,1	2,9	1,8	5,1	3,9
4,5	4,2	3,6	2	1,5	0,7
1,5	1,8	4,5	4,6	3,6	3,2
5,1	4,2	4,2	2,2	3,6	2,7
3	2,5	4,8	5	3	2,7
1,5	1,8	1,8	1,1	1,8	0,9
4,5	4,2	4,5	3,5	2,1	0,9
2,4	2,8	1,5	1,5	1,2	1,5
2,4	3	4,8	4,1	2,7	3,6
2,1	1,5	2,1	2,1	3	1,5

Moyenne : Colorimétrie : 3,4 (1,2 - 8,4) Fluorescence : 2,9 (0,7 - 7,7)

On note généralement une bonne concordance des résultats avec des valeurs légèrement supérieures en colorimétrie. Il est cependant des différences qui restent inexplicables.

L'activité des sérums normaux est faible ; dans nos conditions elle peut cependant être mesurée avec une bonne précision (5 à 20 centièmes de D.O.) alors qu'avec les méthodes à l'alpha-naphtol, l'intensité des colorations est pratiquement nulle (1 à 8 centièmes de D.O.).

L'analyse en flux continu est encore plus sensible, ce qui représente un avantage mais aussi un inconvénient : la créatine initialement présente dans la prise d'essai interfère plus nettement avec celle qui a été libérée par la CPK. Dans les conditions décrites, elle représente en moyenne 10 % de l'activité enzymatique (graphiques 29 et 30).

Il est donc nécessaire d'évaluer cette interférence en utilisant un réactif substrat sans ADP (43) ou en inactivant l'enzyme par chauffage à 65° (52). En fait, il n'est pas toujours utile de doubler le nombre des manipulations si l'on sait que les taux pathologiques de CPK atteignent des valeurs 10 et même 50 fois plus élevées que des valeurs physiologiques.

Les sérums présentant une activité enzymatique élevée, doivent être dilués. GRAIG et coll. (152) ont montré que la dilution dans toutes solutions autres qu'un sérum inactivé conduit à des résultats anormalement élevés. Cet effet serait dû à la présence d'un inhibiteur sérique.

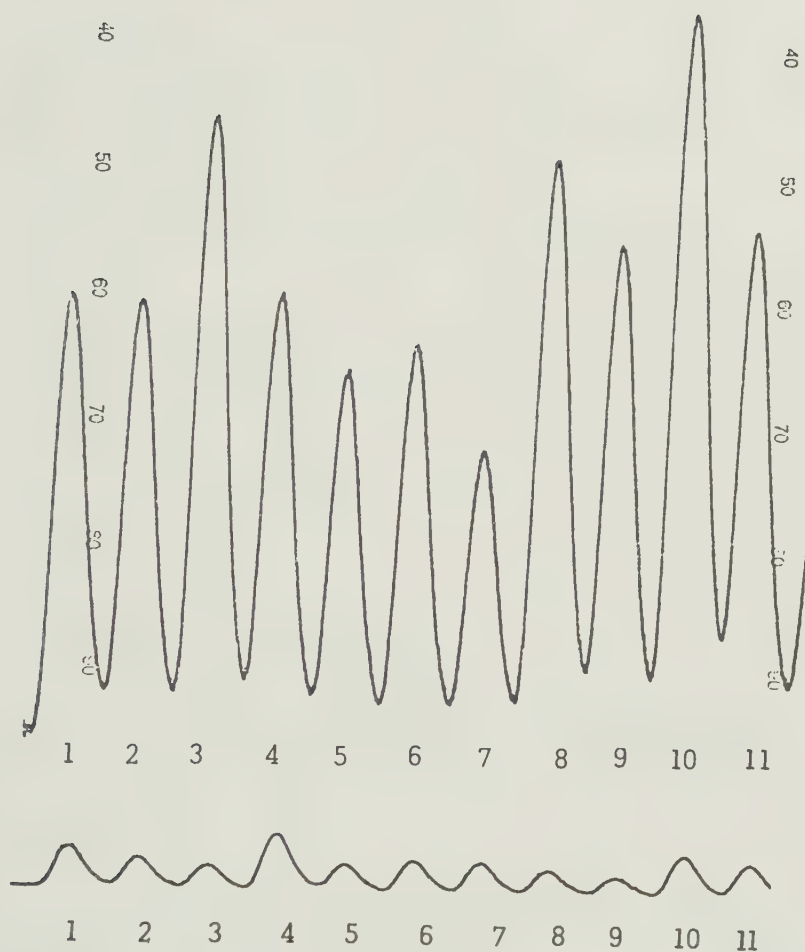
Contrairement aux observations de GRAIG, nous n'avons pas retrouvé d'élévation anormale de l'activité enzymatique en diluant les sérums dans l'eau distillée, et nous effectuons des dilutions aqueuses de sérum.

2 - Spécificité de la réaction

Nous avons vu dans la première partie de ce travail, que la spécificité de la méthode à l'orcinol n'était pas sans défaut.

La principale source d'erreur provient de la créatine initialement présente dans le sérum ; en méthode manuelle elle est très réduite : nous n'avons jamais obtenu de coloration dans des réactions-témoins sans créatinephosphate ou sans ADP.

Nous avons montré dans le paragraphe précédent qu'il n'en était pas tout à fait de même avec l'analyse en flux continu.



Graphiques 29 et 30

Mesure de l'activité de la CPK en méthode automatique.

Tracé supérieur : Activité enzymatique

Tracé inférieur : Dérivés guanidiques initialement
présents (témoins sans substrat).

L'interférence des composés guanidiques autres que la créatine présents dans les milieux biologiques est très limitée : En méthode manuelle l'arginine est éliminée par la défécation, le taux de glycocyamine est peu important en raison de la faible prise d'essai. Or l'introduction dans le milieu réactionnel de 100 nanomoles de dérivés guanidiques, concentration légèrement supérieure aux taux physiologiques apporte seulement une erreur par excès de 7 % pour la glycocyamine (tableau 42).

Tableau 42 : Influence des guanidines dans le dosage de la CPK (Intensité (en D.O) des colorations obtenues avec une surcharge de 200 nanomoles de composés).

Surcharge	Néant	Créatinine	Arginine	Glycocyamine
Intensité	0,68	0,69	0,68	0,73

Conclusions

Les conditions adoptées pour la mesure de l'activité de la CPK en méthode manuelle, permettent un dosage sensible et spécifique de l'enzyme.

L'adaptation à l'analyse en flux continu conduit à une technique encore plus sensible, dont il faut contrôler la spécificité avec un témoin sérum.

E - RESULTATS

1 - Valeurs normales - Variations physiologiques

Dans les conditions décrites, l'activité enzymatique des sérums normaux est de $3,4 \pm 3,2$ micromoles de créatine libérées par ml et par heure.

Les variations physiologiques importantes de la CPK peuvent expliquer l'importance de l'écart type. L'activité enzymatique dépend en effet :

- du sexe : elle est plus élevée chez l'homme que chez la femme (40,142,153,154).

- de l'âge : taux plus important chez l'enfant et en particulier chez le nouveau-né (94, 155)

- de l'exercice physique : on sait que l'exercice physique accroît la libération de la CPK dans le sérum : pour certains auteurs (156,157,158,159,160) les variations ne sont apparentes qu'après un exercice violent mais COLOMBO et coll. (132) puis GRIFFITHS (161) ont montré que l'exercice physique de la vie courante suffit parfois à entraîner une augmentation de la CPK sérique. Pour cette raison, DREYFUS et SCHAPIRA (148) prélèvent après un repos de 20 minutes.

Notons enfin que l'activité enzymatique peut varier pendant la grossesse et à l'accouchement : si les variations sont faibles pendant la grossesse, par contre, on observe une forte augmentation dans les premiers jours suivant l'accouchement (162, 163). Mais COLOMBO et coll. (132) ainsi que FLEISHER et coll. (164) ont retrouvé une baisse marquée de l'activité enzymatique durant le dernier trimestre de la grossesse.

Un dernier groupe de facteurs non physiologiques mais très importants conditionne les résultats des mesures : c'est d'une part le temps écoulé entre le prélèvement et le dosage et le choix de l'anticoagulant d'autre part.

La CPK est en effet une des enzymes les plus labiles et son taux baisse rapidement (165).

Dans le sérum conservé à température ordinaire, on observe une baisse de 40 % en 12 heures (153) ; le froid ralentit la destruction de l'enzyme : 4% + 4° ; la perte d'activité ne serait que de 10 % en 24 heures (132) mais pour PRESTON et coll. (153) elle atteindrait tout de même 50 % ; elle est encore réduite en congelant le sérum (38,1 43,166) ou en ajoutant au milieu de la cystéine (141) ou du glutathion (167).

Généralement nous dosons la CPK le plus rapidement possible après le prélèvement, mais nous avons remarqué que les sérums congelés à -20° conservaient leur activité pendant au moins une semaine. Après plus d'un an à -20° l'activité des sérums avait baissé de 30 à 50 % seulement .

L'influence de l'anticoagulant a été parfois signalée : DREYFUS et SCHAPIRA (38) comme KILIMNICK (168) ont noté un pouvoir inhibiteur de l'héparine et de l'EDTA qui n'est cependant pas toujours retrouvé (107).

Pour éviter tout effet inhibiteur, nous effectuons le dosage sur le sérum.

2 - Variations pathologiques

L'intérêt de la mesure de l'activité de la CPK est fondé sur sa localisation particulière : muscle, coeur, encéphale. Toute élévation du taux de CPK sérique sera le signe d'une nécrose des tissus musculaire, cardiaque ou à un degré moindre nerveux.

L'étude des variations de l'activité créatinephosphokinase dans l'infarctus du myocarde, les maladies musculaires a été très poussée et nous ne ferons que la résumer dans ce travail.

a) Infarctus du myocarde

La CPK permet un diagnostic précoce et spécifique de l'infarctus du myocarde. L'élévation de l'activité enzymatique est très importante ; plus précoce que celle des transaminases, elle apparaît dans les premières heures après l'accident, atteint son maximum vers la 33ème heure et son taux revient à la normale 3 à 4 jours après la nécrose.

- Comparativement aux transaminases ou aux deshydrogénases lactiques, la spécificité de la CPK est évidente du fait de sa localisation particulière.

- Dans plusieurs cas d'infarctus du myocarde, nous avons retrouvé une activité enzymatique sérique supérieure à 100 micromoles de créatine/ml/h.

b) Maladies musculaires

Comme pour l'exploration cardiaque, la CPK présente un caractère très spécifique car l'aldolase par exemple, autre enzyme fréquemment dosée pour tester la valeur fonctionnelle du tissu musculaire, se trouve dans d'autres tissus (foie et globules rouges plus particulièrement).

La CPK est augmentée dans les myopathies d'origine musculaire alors qu'elle reste normale dans les affections d'origine neurogène : les maladies musculaires comme la poliomyélite ne la modifient pas.

Son élévation est maxima dans les myopathies type Duchenne de Boulogne. L'augmentation est beaucoup plus forte que celle de l'aldolase (10 à 50 fois la normale). Cette maladie se transmet comme l'hémophilie selon une récessivité liée au sexe. Les garçons sont touchés alors que les femmes sont transmettrices saines de la tare qui est fixée sur le chromosome X.

La forte augmentation de la CPK dans le sérum des myopathes a permis à DREYFUS et coll. (169), à AEBI et coll. (170) et à THOMSON et coll. (151) de détecter par ce dosage les porteurs sains de la tare myopathique. Les femmes transmettrices de la tare présentent souvent en effet une élévation de l'activité enzymatique.

Chez les enfants atteints de myopathies type Duchenne de Boulogne l'activité enzymatique des sérums que nous avons dosés était proche de 400 micromoles/ml/heure et nous avons pu déceler les femmes porteuses de la tare chez qui l'activité de la CPK était voisine de 30 micromoles.

c) Syndromes divers

Une élévation de la CPK peut être retrouvée dans le sérum ou le liquide céphalorachidien des malades présentant une nécrose des tissus nerveux (171,172,173,174,175).

Etant donné le rapport entre les hormones thyroïdiennes et le tissu musculaire, il n'est pas étonnant d'observer des variations de la CPK dans les affections thyroïdiennes où le taux de CPK est inversement proportionnel à l'activité de la thyroïde : augmentation dans le myxoedème, baisse dans l'hyperthyroïdie (164,176,177).

Des augmentations de l'activité enzymatique ont été enfin signalées après intoxication par l'oxyde de carbone (178), dans le délirium trémens (179), les coliques de plomb, coliques néphrétiques, après traitement émétinien (180), dans le tétanos (181), certaines affections pulmonaires ou après traitement par l'insuline (182). Dans la plupart des cas, il est possible de mettre en évidence des lésions musculaires secondaires qui expliquent l'élévation de la CPK.

Conclusions

La CPK permet un diagnostic précoce et spécifique de l'infarctus du myocarde et l'étude différentielle des myopathies. L'élévation du taux de CPK est tellement importante que les variations physiologiques restent négligeables et ne nuisent pas à l'interprétation des résultats.

CONCLUSIONS SUR L'ETUDE DE LA CREATINEPHOSPHOKINASE SERIQUE

L'adaptation à la mesure de la CPK de la méthode de dosage de la créatine décrite dans la première partie de ce travail, nous a permis de définir de nouvelles conditions de dosage de l'enzyme.

L'activité de la CPK est mesurée en dosant colorimétriquement la créatine libérée après l'hydrolyse du créatinephosphate en présence d'ADP et de mercaptoéthanol.

Les conditions décrites permettent un dosage sensible et spécifique de l'enzyme.

Nous avons adopté cette méthode à l'analyse en flux continu et nous disposons d'une technique encore plus sensible.

Ces deux procédés trouvent leur application dans l'étude des variations physiopathologiques de l'activité enzymatique, dont les principales indications sont l'infarctus du myocarde et les myopathies type Duchenne de Boulogne.

C H A P I T R E X

SEPARATION ELECTROPHORETIQUE DES ISOENZYMES DE

LA CREATINEPHOSPHOKINASE DU SERUM

Le dosage global de la CPK n'est pas toujours suffisant ; en présence d'une activité enzymatique élevée, il est souvent intéressant de connaître l'origine de l'enzyme apparue dans le sérum. Nous avons donc mis au point une méthode électrophorétique de séparation des trois dimères de CPK, aisément applicable en chimie clinique.

A - METHODES EXISTANTES

Les premiers travaux sont dûs à WOOD (76). WOOD a montré qu'en électrophorèse, la CPK de cerveau migrerait plus rapidement que l'enzyme musculaire. Cette différenciation a été confirmée par les travaux de BURGER et coll. (183) qui ont séparé les trois formes moléculaires de CPK : MM, MB, BB.

Depuis de nombreuses méthodes ont été mises au point : elles font appel à des conditions très variées du point de vue matériel biologique, supports, tampons et modes de révélation.

a) Matériel biologique

La mise au point des techniques a été réalisée à partir d'homogénats d'organes prélevés chez l'homme, le rat, le lapin, le poulet. Les tissus sont broyés dans l'eau distillée (184, 185), des solutions tampons (86, 186) ou du saccharose (187, 188).

b) Conditions de l'électrophorèse

L'électrophorèse a été conduite sur de nombreux supports : papier (189), gélose (190, 191, 192), acétate de cellulose (185, 188), agarose (186), gel d'amidon (193) ou de polyacrylamide (194).

Les tampons préconisés de pH = 8,4 à 9 sont à base de véronal, TRIS-NaCl ou TRIS-glycine.

La durée de la migration qui est généralement conduite à basse température est de 20 à 90 minutes pour les électrophorèses rapides ; elle est portée à 15-16 heures si le support est le papier ou l'amidon.

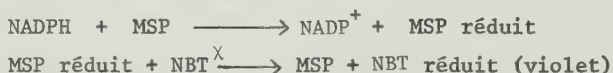
c) Modes de révélation

Les techniques de mesure de l'activité enzymatique ont été adoptées aux isoenzymes séparées par électrophorèse. On révèle le créatinephosphate, ADP ou ATP mais aucune méthode n'est basée sur la révélation de la créatine.

- créatinephosphate : on met à profit la coloration bleue donnée par le phosphore du créatinephosphate en présence de molybdate d'ammonium (191).

- ADP : La créatine kinase est associée à la pyruvate-kinase et à la déshydrogénase lactique : la disparition de la fluorescence due à la consommation de NADH dans la dernière réaction, révèle l'activité enzymatique (190, 191).

- ATP : ATP est engagé dans la suite des réactions de KORNBERG: NADPH formé dans la réaction finale est alors révélé par fluorescence UV (186) ou selon la technique préconisée par VAN DER HELM et coll. (195) pour les deshydrogénases lactiques, avec du méthosulfate de phénazine (MPS) et un sel de tétrazolium (78,145,187,194).



Comme pour les méthodes de dosage, la révélation du créatinephosphate est peu sensible alors que celles d'ADP ou ATP manque de spécificité : les taches apparues sur des bandes témoins sans substrat sont le reflet d'une activité phosphatasique (196), ATP-asiqne (191) ou myokinasiqne (145, 187).

Bien que les techniques de mesure de l'activité CPK basées sur le dosage de la créatine soient plus sensibles et plus spécifiques, elles n'avaient cependant pas été appliquées en électrophorèse à la révélation des isoenzymes : c'est ce que nous avons tenté (197).

Mais depuis la publication de notre méthode nous devons signaler les travaux de MENACHE et coll. (189) qui dosent la créatine après élution des fractions repérées par rapport aux protéines.

B - MODE DE SEPARATION DES ISOENZYMES DE CPK AVEC REVELATION DE LA CREATINE

Nous avons effectué la mise au point de la méthode avec des

X NBT = nitrobleue tétrazolium (chlorure de di-p.nitrophényl-2,2', diphényl-5,5', diméthoxy-3,3', diphénylène-4,4' ditétrazolium).

broyats de muscle, coeur et cerveau de souris puis nous avons testé les sérums humains : les tissus sont broyés à + 4° dans 10 volumes de solution de saccharose 0,25 M puis centrifugés à la même température. Le surnageant est déposé.

Parmi les supports testés l'acétate de cellulose gélatineux (type cellogel) nous a donné de bons résultats : il permet un dépôt assez important (20 à 40 microlitres), une migration rapide et une diffusion moindre.

Le dépôt est de 20 à 30 microlitres de sérum ; il est réduit à 5 microlitres pour les homogénats de tissu musculaire.

La migration a lieu en tampon véronal de pH = 8,6 sous une tension de 150 volts pendant 90 minutes.

La révélation comporte deux phases : hydrolyse du créatine-phosphate puis mise en évidence de la créatine libérée.

Sur la bande d'électrophorèse, nous faisons agir 10 minutes à l'étuve à 37° un mélange de substrats comprenant l'ADP, le créatine-phosphate et le mercaptoéthanol à des concentrations correspondant à celles préconisées pour le dosage.

La créatine libérée est dans un deuxième temps révélée par colorimétrie en milieu alcalin avec le dioxo-2,3 butane, l'orcinol et la lactone de l'acide glucuronique ou par fluorimétrie avec la ninhydrine en milieu alcoolique et alcalin. Les concentrations respectives des réactifs sont celles précédemment définies.

L'activité enzymatique se traduit par le développement d'une coloration rouge ou d'une fluorescence verte sous lumière de WOOD.

Mais alors que la fluorescence apparait presque instantanément, le développement de la réaction colorée nécessite un temps de latence pendant lequel il se produit une diffusion qui rend la lecture difficile. Pour cette raison, nous préférons révéler les isoenzymes de CPK par fluorescence.

Les détails pratiques sont décrits dans l'annexe à la fin de notre travail.

C - RESULTATS

Nous avons séparé les trois formes moléculaires de CPK (fraction I - II - III) ; chez la souris l'isoenzyme lente correspondant au dimère MM est présente dans les broyats musculaires ; la forme rapide (type BB) se trouve dans l'encéphale tandis que l'on retrouve l'hybride MB, de migration électrophorétique intermédiaire, associé au dimère MM dans le coeur.

Malgré la sensibilité de la méthode, l'électrophorèse des sérums humains normaux ne révèle aucune activité enzymatique. C'est le cas des techniques citées dans la littérature puisque, lorsque des bandes ont été observées, elles correspondent à des activités non spécifiques (187). Notons toutefois que MENACHE et coll. (189), révélant la CPK en dosant la créatine après élution, ont obtenu trois bandes avec des sérums normaux.

Par contre, il est possible d'identifier la forme moléculaire de CPK présente dans les sérums à activité enzymatique élevée.

Les sérums des malades atteints de dystrophie musculaire révèlent une activité marquée au niveau de la fraction MM (184, 192). On peut parfois mettre en évidence en plus du dimère MM, une activité au niveau de l'isoenzyme intermédiaire (187).

Dans l'infarctus du myocarde, la forme MM a été également retrouvée et si le prélèvement est fait suffisamment tôt après l'accident, l'isoenzyme intermédiaire (187) peut être décelée.

L'électrophorèse de sérum d'hypothyroïdiens ressemble à celle obtenue avec des broyats de muscle (189).

Dans les quelques sérums d'infarctus que nous avons pu étudier, nous avons toujours retrouvé l'isoenzyme lente de type MM et plus rarement l'hybride MB.

L'électrophorèse des sérums de myopathe (type Duchenne de Boulogne) a révélé une forte bande au niveau de la fraction MM.

Nous avons représenté dans le schéma suivant les résultats obtenus avec les broyats d'organes lors de la mise au point de la méthode et avec les sérums des malades frappés d'infarctus du myocarde ou atteints d'une myopathie type Duchenne de Boulogne.

dépôt —

						- Muscle
						- Coeur
						- Encéphale
						- Infarctus du myocarde
						- Myopathie type Duchenne de Boulogne
BB	MB	MM				

CONCLUSIONS

L'activité enzymatique des formes moléculaires de CPK séparées par électrophorèse est décelée en révélant par fluorescence la créatine libérée. Comme pour les méthodes de mesure de la CPK, cette technique présente le double avantage d'être plus sensible et plus spécifique.

C'est une méthode directe sans couplage avec des réactions secondaires et qui fait appel au sens de la réaction le plus rapide. La sensibilité pourrait être encore améliorée en prolongeant le temps d'incubation à l'étuve mais nous avons vérifié que les phénomènes de diffusion augmentent avec le temps et limitent l'intérêt de cette amélioration.

Le second avantage de notre méthode est sa spécificité : les techniques existantes révèlent une activité non créatinephosphokinase mise en évidence sur des bandes témoins sans substrat. Dans les conditions définies, nous n'obtenons aucune tache sur les bandes témoins sans créatinephosphate.

L'électrophorèse représente donc un procédé rapide, sensible et spécifique de séparation des formes moléculaires de CPK. Elle a l'avantage d'être bien adaptée aux conditions d'analyses dans les laboratoires et aux exigences de la clinique : elle nécessite peu de produit biologique et ne demande pas de matériel très spécialisé.

Les vérifications, bien que peu nombreuses que nous avons effectuées, nous ont permis de déceler les variations de la CPK dans l'infarctus du myocarde et les myopathies type Duchenne de Boulogne.

C H A P I T R E X I

CHROMATOGRAPHIE DES FORMES MOLECULAIRES MULTIPLES DE CPK

La chromatographie représente un deuxième procédé de séparation des isoenzymes.

Alors que l'électrophorèse, méthode rapide, demandant peu de matériel biologique, est bien adaptée aux exigences de la clinique, la chromatographie, par contre a valeur de méthode préparative et permet le recueil de fractions séparées et purifiées pour une étude des formes moléculaires multiples.

Deux types de chromatographie en phase liquide sont utilisés, soit isolément, soit couplés : la filtration sur gel et la chromatographie d'échanges d'ions.

La première jouant le rôle de tamis moléculaire est plus répandue comme méthode de purification mais elle a cependant permis à ESTBORN (198) de séparer les phosphatases alcalines tandis que KLEINER et GRAFF (199) isolaient deux isoenzymes de la L-leucyl-béta-naphthylamide hydrolase.

La chromatographie d'échanges d'ions sur DEAE Cellulose, introduite en 1956 par SOBER et coll. (200) en vue du fractionnement des protéines est très couramment employée en enzymologie. Elle a même été transposée au papier (201).

L'emploi de DEAE Sephadex, qui associe le phénomène de filtration et celui de l'échange d'ions avec prédominance du premier, a permis le fractionnement des deshydrogénases lactiques et d'autres isoenzymes.

Ces méthodes ont été peu appliquées à la séparation des formes moléculaires de CPK. A notre connaissance, seuls DAWSON et coll. (77, 78) ont séparé par chromatographie sur colonne de DEAE Cellulose les trois isomères tandis que DUBO et coll. (202) adaptaient à la CPK la méthode d'adsorption en tube sur DEAE Sephadex antérieurement décrite par RICHTERICH et coll. (203) à propos des deshydrogénases lactiques. Auparavant, le passage sur colonne de DEAE Cellulose ou DEAE Sephadex n'avait été employé que dans un but de purification de la CPK (76, 93, 123).

En utilisant des broyats de muscle, de coeur et d'encéphale de souris et de lapin comme source d'enzyme, nous avons mis au point une méthode de séparation des trois dimères de la CPK, par chromatographie sur colonne de DEAE Cellulose. L'analyse de l'éluat, comprenant la mesure de l'activité enzymatique et le dosage des protéines est réalisée en méthode manuelle ou en flux continu.

A - CHROMATOGRAPHIE

Le matériel biologique est déposé en milieu phosphaté (solution de Na_2HPO_4 0,002 M de pH = 7) et les isoenzymes sont éluées par un gradient de pH et de force ionique.

1) Préparation des tissus

Elle est identique à celle préconisée pour l'électrophorèse. Les tissus sont broyés à + 4° avec 10 volumes de solution de saccharose 0,25 M puis centrifugés à la même température. Le surnageant est retenu pour l'analyse.

Compte tenu de la grande labilité de la CPK et des données contradictoires concernant les moyens de conservation des broyats, il est préférable de procéder à une préparation extemporanée. Toutefois, la CPK d'origine musculaire garde ses propriétés à l'état congelé.

2) Conditionnement de la DEAE Cellulose

Comme échangeur d'ions, nous préférons la DEAE Cellulose au DEAE Sephadex parce que son conditionnement est plus aisé ; la DEAE Cellulose est d'autre part, moins sensible aux variations de pH et de température ; elle est plus facilement régénérée et les contaminations bactériennes sont peu fréquentes.

Nous avons utilisé une DEAE Cellulose BROWN (Selectacel DEAE STD 3513). Son conditionnement comporte l'élimination des particules fines, le passage de la cellulose à la forme anionique puis la mise en suspension dans la solution Na_2HPO_4 0,002 M de pH = 7.

Mettre 3 à 4 g de DEAE Cellulose en suspension dans 20 volumes de NaCl 0,01 M. Après agitation, décanter le surnageant. Reprendre par 10 volumes de NaCl 0,01 M - Agiter 30 minutes - Décanter. Ajouter 15 volumes de NaOH 0,5 N. Agiter 30 à 60 minutes - Décanter. Laver la DEAE Cellulose anionique par l'eau bidistillée jusqu'à neutralité du liquide de lavage et remettre en suspension dans 20 volumes de solution Na_2HPO_4 0,002 M de pH = 7.

3) Préparation de la colonne

La DEAE Cellulose maintenue homogène par agitation est versée dans la colonne réfrigérée à + 4°, remplie avec la solution Na_2HPO_4 0,002 M. On laisse passer la solution jusqu'à stabilisation de la colonne en réglant son débit par clampage en sortie de colonne à 0,2 ml/mn.

4) Dépôt de l'échantillon

Pour une colonne de 30 cm de hauteur et 1,5 cm de diamètre, le volume de l'homogénat à déposer correspond à 3 à 4 µg de protéines.

5) Elution

Les différentes fractions sont éluées par démarrage du gradient de pH et de force ionique. Ce gradient est réparti en trois bacs : 100 ml de solution $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 0,002 M de pH = 7 et deux fois 100 ml de solution $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 0,4 M + NaCl 0,4 M de pH = 6.

L'éluat est recueilli par fraction de 1 à 2 ml. Si l'analyse est réalisée par voie automatique, la sortie de colonne est alors relié à l'autoanalyseur au moyen d'un dispositif PT2.

B - ANALYSE DE L'ELUAT

L'analyse de l'éluat est réalisée en méthode manuelle et automatique. Elle comporte le dosage des protéines et la mesure simultanée de l'activité enzymatique.

a) Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode de LOWRY modifiée (204) : on mesure la coloration bleue obtenue en milieu alcalin avec le réactif phosphotungstique de Folin-Ciocalteu sensibilisé par addition d'ions cuivriques.

Nous avons légèrement accru la sensibilité de la technique en doublant la prise d'essai et en effectuant la lecture en cuve de 2 cm.

L'étalonnage est réalisé avec une solution d'albumine bovine à 10 g %, diluée pour obtenir des concentrations de 5 à 500 mg/l.

Les conditions du dosage automatique sont représentées dans le diagramme de flux ci-après.

Il ne présente pas de particularités importantes si ce n'est l'addition d'une double bobine de délai. Ce dispositif est destiné à retarder l'enregistrement qui se superpose alors exactement à celui de l'activité enzymatique (graphique 31).

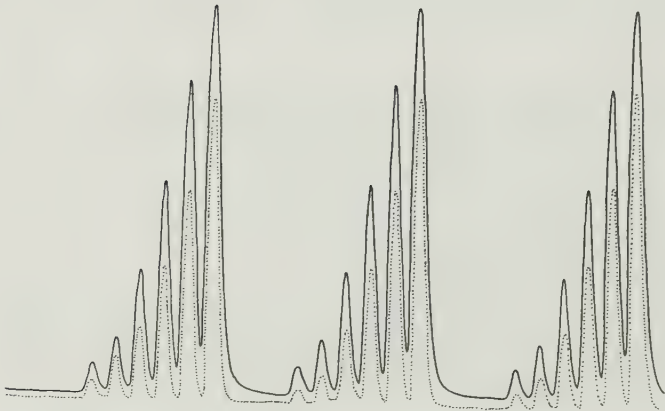
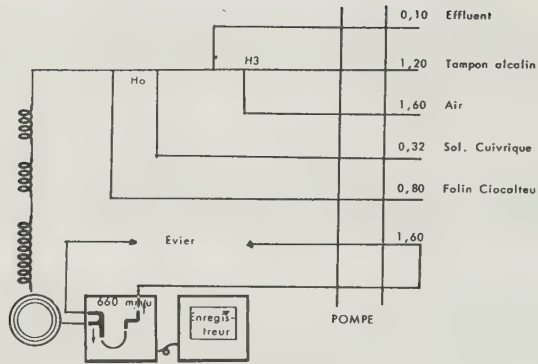
Il est à noter que cet allongement volontaire du temps de réaction ne peut qu'être avantageux puisqu'il conduit à un léger gain de sensibilité.

b) Mesure de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique est mesurée en méthode automatique selon le mode opératoire précédemment décrit (chapitre VIII).

PROTEINES

Diagramme des flux - Réactifs.



Graphique 31 Chromatographie des isoenzymes de la créatine-phosphokinase avec analyse automatique de l'éluat : Etalonnage de l'activité enzymatique (tracé plein) et des protéines (tracé pointillé)-Reproductibilité de trois étalonnages.

C - RESULTATS

La chromatographie permet la séparation des trois formes moléculaires de CPK, correspondant aux dimères MM, MB et BB. Dans les conditions décrites, la chromatographie dure 15 heures et les volumes moyens d'élution sont respectivement de 46, 68 et 93 ml.

A titre d'exemple, le graphique 32 représente schématiquement les courbes obtenues à partir d'un mélange d'homogénats de muscle et d'encéphale de souris tandis que le tableau 43, rassemblant les résultats de cinq chromatographies rend compte de la bonne reproductibilité de la méthode.

Tableau 43 : Chromatographies d'homogénats de muscle et d'encéphale de souris : volumes d'élution des différentes fractions (ml)

Chromatographie	Dimère MM	Dimère BB
N° 1	48	95
N° 2	48	95
N° 3	47,5	90
N° 4	48	90
N° 5	44	90

La séparation s'effectue dans le même ordre qu'en électrophorèse : l'isoenzyme de type MM passe la première tandis que le dimère BB, fortement retenu par l'échangeur n'est élué que par augmentation de la force ionique et baisse du pH.

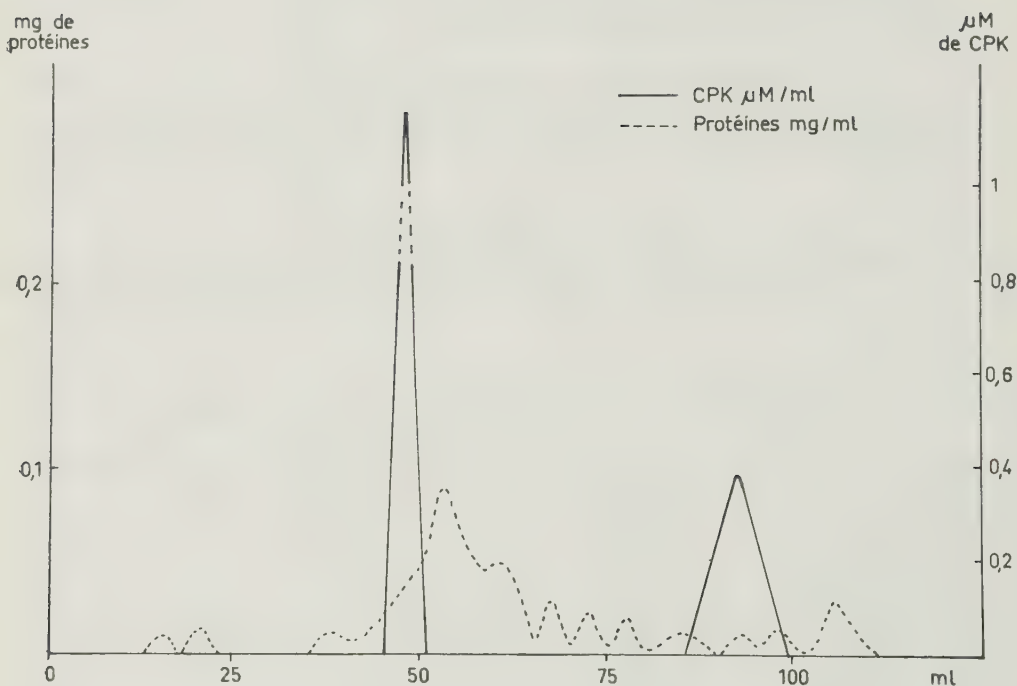


FIG. 6. — Séparation chromatographique d'homogénats de muscle et d'encéphale de souris.

Volumes d'élution des différentes fractions,
mesure de l'activité enzymatique et dosage des protéines.

La chromatographie d'homogénats d'organes de souris confirme donc les résultats obtenus en électrophorèse. Le tissu musculaire contient le dimère MM tandis que l'on retrouve la forme BB dans les homogénats d'encéphale ; l'hybride MB est associé au dimère MM dans les broyats de tissu cardiaque.

Il faut cependant noter que la chromatographie de broyats d'encéphale conduit parfois à l'obtention de deux fractions ; en plus du pic habituel correspondant au dimère BB, un pic de faible intensité se retrouve au niveau de l'isoenzyme musculaire.

L'origine de ce pic est encore inconnue : est-il dû à la présence d'une trace de tissu musculaire entraîné au cours de l'extraction ou est-ce la conséquence d'une dénaturation partielle de l'enzyme. La CPK est en effet une des enzymes les plus labiles et de nombreux facteurs peuvent la dénaturer partiellement : conditions d'extraction, fixation de l'enzyme sur l'échangeur, durée de la chromatographie qui peut amener comme cela a été démontré pour les deshydrogénases lactiques, une multiplication du nombre des bandes (205).

Cependant, en électrophorèse DAWSON et coll. (77) ont montré que lorsque l'enzyme de type BB est dénaturée par l'urée 8 M ou par congélations et décongélations successives, elle conduit à la formation de deux bandes très proches l'une de l'autre sans activité au niveau du dimère MM. D'autre part, des chromatographies d'homogénats d'encéphale réalisées en présence de mercaptoéthanol (concentration finale 0,001 M) composé fréquemment utilisé pour éviter la dénaturation des enzymes, conduisent aussi à l'obtention de deux fractions dont les volumes d'élution correspondent aux formes BB et MM. Ces expériences sont donc en faveur d'une absence de dépolymérisation de la CPK pendant la séparation.

L'étude de la répartition des isoenzymes a montré qu'elle variait avec l'espèce. Les principaux travaux ont été réalisés en électrophorèse et aucune étude détaillée n'a encore été effectuée après chromatographie. Les conclusions étant identiques quel que soit le mode de séparation utilisé, nous résumerons rapidement dans ce chapitre les variations observées.

- Muscle

Les broyats tissulaires renferment toujours la forme MM mais VAN DEN VEEN et WILLEBRANDS (187) puis DAWSON et FINE (78) ont chez l'homme, comme SCHERWIN et coll. (186) chez le lapin, décelé en plus de la fraction MM, une faible activité au niveau de la fraction intermédiaire tandis que KAR et PIERSON (206) étudiant la CPK musculaire chez l'homme ont isolé trois fractions dont la première correspondrait au dimère MM.

Les résultats sont encore différents avec les homogénats de muscle lisse : les travaux de DAWSON et FINE (78) chez l'homme, SHERWIN et coll. (186) chez le lapin conduisent à penser qu'il s'agit d'une même isoenzyme. ROSALKI (185), par contre, a obtenu deux fractions après électrophorèse d'un muscle strié humain alors qu'il met en évidence uniquement la fraction MM classique pour le muscle lisse.

- Encéphale

Les homogénats d'encéphale contiennent l'isoenzyme de type BB mais les résultats sont plus contradictoires avec les broyats de tissus nerveux autres que l'encéphale : BURGER et coll. (190) ont isolé des broyats de nerf optique de lapin les dimères BB et MM alors que SHERWIN et coll. (186) ne retrouvent que la forme BB. Ces derniers, ont, par contre, mis en évidence la fraction MM dans les broyats de nerf sciatique de lapin. Comme pour les déshydrogénases lactiques, le système nerveux central contiendrait la forme BB tandis que l'enzyme contenue dans le système nerveux périphérique serait le dimère MM (186).

- Coeur

Les résultats de l'étude de la CPK cardiaque sont encore plus variables. Le tissu cardiaque de lapin contiendrait l'isoenzyme MM (190) qui serait parfois accompagnée d'un faible taux de l'hybride MB.

DAWSON et coll. (69) ont montré que les broyats de coeur de poulet renfermaient les fractions BB et MB et que le taux de l'enzyme intermédiaire variait en fonction de l'âge de l'animal, tandis que HOOTON (103) retrouve deux bandes proches l'une de l'autre, migrant approximativement comme l'enzyme rapide de cerveau, même avec des homogénats fraîchement préparés.

EPPENBERGER et coll. (207) ont mis en évidence chez le poulet et le rat les fractions MB et MM.

Chez l'homme, l'isoenzyme MM toujours présente est parfois accompagnée de l'hybride MB (185). DEUL et VAN BREEMEN (191) ont isolé cinq fractions mais signalent que les résultats sont peu reproductibles.

- Autres organes

La CPK retrouvée en faible quantité dans les poumons, les reins, la rate, la vessie, la thyroïde, correspond à l'isoenzyme BB. Cependant GRAIG et SMITH (208) ont mis en évidence les trois isoenzymes dans les broyats de thyroïde de lapin.

Chez la souris, nous avons retrouvé la répartition classique des formes moléculaires de CPK : le dimère MM dans le muscle et le coeur, la forme BB dans l'encéphale et l'hybride dans le tissu cardiaque.

Des chromatographies de broyats d'organes de lapin ou une préparation commerciale purifiée de CPK extraite du muscle de lapin conduisent à des résultats identiques à ceux définis chez la souris.

CONCLUSIONS

Nous avons décrit un procédé de séparation des isoenzymes de la CPK par chromatographie sur colonne de DEAE Cellulose. Dans les conditions opératoires décrites, les trois formes moléculaires sont nettement séparées : les volumes d'élution respectifs sont de 46, 68 et 93 ml.

C H A P I T R E X I I

INFLUENCE DES IONS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

L'étude de l'effet des ions relève d'un double but : elle représente un procédé de différenciation des isoenzymes mais permet également d'approfondir nos connaissances dans les mécanismes de régulation de l'activité enzymatique.

C'est ainsi que VESELL et coll. (209) ont différencié certaines isoenzymes de la deshydrogénase lactique, NISSELBAUM (210), celles de l'aspartate aminotransférase tandis que HAECKEL et coll. (211) d'une part, BAILEY et coll. (212) d'autre part étudiaient la régulation allostérique de la pyruvate kinase.

Il faut distinguer l'effet des cations de celui des anions : on sait en effet que les cations sont nécessaires à l'activité enzymatique : ils s'unissent au substrat pour former un complexe qui représente le véritable substrat ; ils stabilisent également la structure spatiale de l'enzyme. Ce sont généralement des cations divalents comme le calcium et le magnésium mais certaines enzymes telle que la pyruvate kinase sont activées par des cations monovalents (211).

Nous avons indiqué, dans le chapitre VIII le rôle des cations et en particulier celui du magnésium. Par contre l'influence des anions n'a pas encore été beaucoup étudiée avec la CPK et à notre connaissance, seuls NODA et coll. (100) ont signalé sans autres précisions l'effet inhibiteur des chlorures et des sulfates sur l'enzyme musculaire.

Les expériences de VESELL et coll. (209) avec les deshydrogénases lactiques comme celles de NISSELBAUM (210) avec l'aspartate aminotransférase, ayant mis en évidence un effet variant avec la forme moléculaire considérée, nous nous sommes attachée à l'étude de l'effet des ions sur les isoenzymes de la CPK.

CONDITIONS

Nous avons vérifié l'effet des sulfates et des chlorures de sodium, magnésium, et ammonium ainsi que celui du phosphate de sodium, principaux sels de l'organisme. Les essais ont été réalisés avec la CPK extraite de broyats de muscle et d'encéphale de souris et avec une préparation commerciale de CPK.

musculaire, ainsi qu'avec des fractions purifiées par chromatographie sur DEAE Cellulose.

Les homogénats sont obtenus par broyage des tissus à + 4°C dans 10 volumes de solution de saccharose 0,25 M selon le procédé exposé pour l'électrophorèse.

L'activité enzymatique des fractions diluées dans le tampon imidazole acétate de magnésium est mesurée avec la méthode en flux continu. Les sels introduits à des concentrations finales variant de 0,0002 M à 0,25 M sont mis en contact avec l'enzyme dans le godet de prélèvement juste au moment de l'analyse.

RESULTATS

1 - C.P.K. MUSCULAIRE

Avec la CPK musculaire, l'effet observé est identique pour tous les sels testés : les solutions contenant moins de 50 millimoles de sels provoquent une légère intensification de l'activité enzymatique (10 à 20 %) qui est au contraire inhibée en présence de plus de 50 millimoles de sels.

Les variations observées avec des faibles concentrations salines ne nous semblent pas significatives ; par contre l'effet inhibiteur des taux élevés est plus net.

Nous avons étudié avec plus de détails cet effet inhibiteur en comparant l'influence des fortes concentrations salines sur la CPK commerciale, enzyme purifiée extraite du muscle de lapin (tableau 44).

L'examen de ce tableau met en évidence le net pouvoir inhibiteur des sulfates ; les chlorures et les phosphates sont nettement moins actifs puisqu'une concentration de 100 millimoles n'apporte que 10 % d'inhibition.

Ces résultats sont partiellement en contradiction avec ceux de NODA et coll. (100) qui avaient signalé le pouvoir inhibiteur des sulfates mais aussi celui des chlorures. Ces variations pourraient provenir de la méthode de mesure de la CPK : nous avons dosé la créatine libérée tandis que NODA et coll. mesurent l'activité créatinekinasique en utilisant la réaction inverse (apparition du créatinephosphate).

La régulation de l'activité enzymatique semble dépendre plus de l'anion que du cation puisque pour un même anion les variations sont de même ordre quel que soit le cation.

Des observations analogues ont déjà été obtenues par NISSELBAUM (210) pour l'aspartate aminotransférase. Le pouvoir inhibiteur de Mg SO_4 est toutefois plus important que celui des autres sulfates.

Tableau 44 : Effet des sels sur la CPK musculaire.
(Résultats exprimés en pourcentage d'activité)

Concentrations (millimoles)	0	50	100	250
NaCl	100	107	89	64
MgCl_2	100	104	90	64
$\text{Na}_2 \text{HPO}_4$	100	111	96	71
$\text{Na}_2 \text{SO}_4$	100	80	66	46
Mg SO_4	100	69	55	34
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	100	79	65	44

Nous avons vérifié si les effets déterminés avec la CPK purifiée, extraite du muscle de lapin, étaient également obtenus avec d'autres préparations.

C'est le cas pour l'enzyme extraite des broyats de muscle de souris (tableau 45). Par contre, l'activité enzymatique du dimère MM isolé par chromatographie n'est pas inhibée même avec 250 millimoles de NaCl .

Tableau 45 : Comparaison de l'effet des sulfates sur la CPK de muscle de souris et de lapin
(résultats exprimés en pourcentage d'inhibition)

Sels	Muscle de Souris	CPK purifiée de Lapin
$\text{Na}_2 \text{SO}_4$ 0,025 M	11 %	15 %
$\text{Na}_2 \text{SO}_4$ 0,25 M	58 %	54 %
Mg SO_4	64 %	66 %

BOYDE (213) ayant montré que les constantes de MICHAELIS dépendaient de la force ionique du milieu, nous avons déterminé les "Km" de la CPK avec différents sels.

Les graphiques 33 et 34 montrent l'effet de $\text{Na}_2 \text{SO}_4$ et de NaCl sur l'affinité de la CPK vis-à-vis du créatinephosphate calculée d'après la représentation de LINEWEAVER - BURK.

Les résultats sont difficilement interprétables. On peut cependant observer que NaCl modifie plus l'affinité de l'enzyme pour le créatinephosphate que $\text{Na}_2 \text{SO}_4$.

Nous n'avons pas représenté l'effet de $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$; il est comparable à celui de NaCl tandis que celui de Mg SO_4 est du même type que celui de $\text{Na}_2 \text{SO}_4$.

2 - CPK EXTRAITE DE L'ENCEPHALE

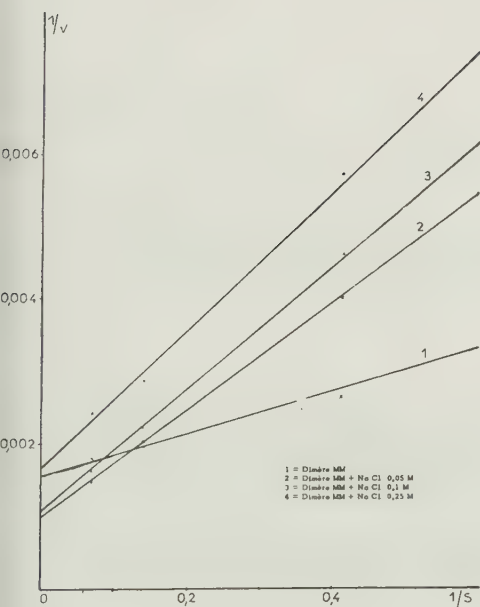
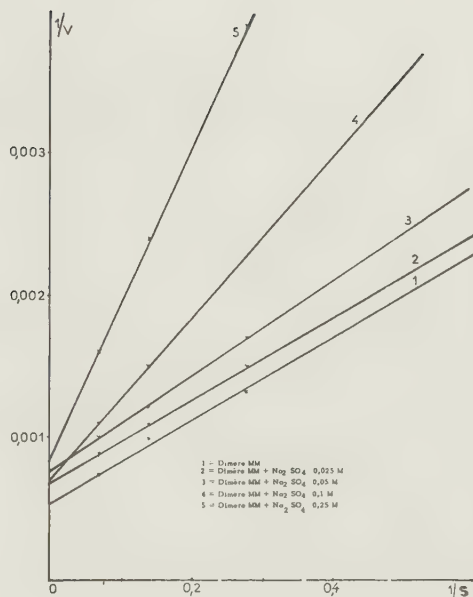
Les essais ont été conduits comme ceux réalisés avec la CPK musculaire.

Les faibles concentrations salines provoquent une légère intensification de l'activité enzymatique, comparable à celle signalée avec le dimère MM.

Par contre, le tableau 46 rassemblant les résultats obtenus avec 50, 100 et 250 millimoles de composés, montre que dans ces conditions les sels agissent différemment sur l'enzyme extraite de l'encéphale et sur la CPK musculaire.

Graphique 33

Effet de Na_2SO_4 sur l'affinité du dimère MM pour le créatine-phosphate-Représentation selon LINEWEAVER-BURK. (V = vitesse de la réaction exprimée en micromoles de créatine libérées).



Graphique 34

Effet de NaCl sur l'affinité du dimère MM pour le créatine-phosphate-Représentation selon LINEWEAVER-BURK. (V = vitesse de la réaction exprimée en micromoles de créatine libérées).

Tableau 46 : Effet des sels sur la CPK extraite de l'encéphale.
(Résultats exprimés en pourcentage d'activité)

Concentrations (millimoles)	0	50	100	250
Na Cl	100	121	124	113
Na ₂ HPO ₄	100	116	108	67
Na ₂ SO ₄	100	89	77	51
Mg SO ₄	100	80	61	44

La différence la plus sensible est observée avec Na Cl qui intensifie toujours l'activité enzymatique même à de forte concentration.

Notons toutefois que Na Cl ne modifie pas l'activité du dimère BB isolé par chromatographie.

Le pouvoir inhibiteur des sulfates, sels toujours les plus actifs, est légèrement moins intense sur l'enzyme de type BB. Par contre, l'effet de Na₂ HPO₄ est identique à celui obtenu avec l'enzyme musculaire.

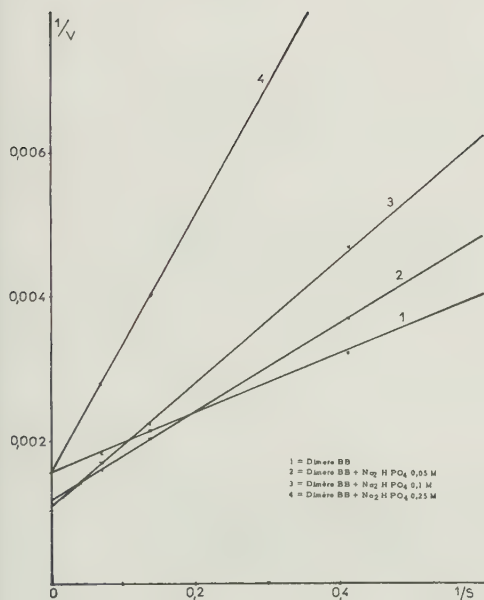
L'effet des sels sur l'affinité de l'enzyme BB pour le créatine-phosphate, est représenté dans les graphiques 35 et 36. Na Cl ne modifie pas l'affinité de l'enzyme pour le créatinephosphate tandis que l'inhibition de Na₂HPO₄ conduit à des variations similaires à celles observées avec la CPK musculaire.

A la lumière de ces expérimentations, il semble donc possible de différencier la CPK musculaire et celle de l'encéphale en présence de fortes concentrations de Na Cl alors que l'effet des phosphates et des sulfates est pratiquement identique sur les deux dimères.

Ces résultats diffèrent de ceux observés avec d'autres enzymes où la différenciation était possible en présence de phosphates et de sulfates.

Graphique 35

Effet de NaCl sur l'affinité du dimère BB pour le créatine-phosphate - Représentation selon LINEWEAVER-BURK. (V = vitesse de la réaction exprimée en micromoles de créatine libérées).



Graphique 36

Effet de Na_2HPO_4 sur l'affinité du dimère BB pour le créatine-phosphate - Représentation selon LINEWEAVER-BURK. (V = vitesse de la réaction exprimée en micromoles de créatine libérées).

Mais les essais ont eu lieu en présence de sels de magnésium et de tampon imidazole obligatoirement introduits dans le milieu pour développer l'activité enzymatique et pour stabiliser la CPK trop instable en milieu aqueux.

Or cette interférence des tampons et des sels nécessaires au développement de l'activité enzymatique signalée par BOYDE (213) pour l'aspartate aminotransférase est confirmée par les travaux de NISSELBAUM (210) qui obtient des résultats variant avec la nature du tampon initialement introduit dans le milieu.

Dans les conditions décrites, Na Cl représente donc un moyen de différenciation des dimères de CPK mais l'effet des sels peut être perturbé par les ions et les substances initialement présentes dans le milieu.

Le deuxième but de notre étude était de tenter d'élucider les mécanismes de régulation des différentes formes de CPK.

Nous avons vu que les résultats obtenus étaient difficilement interprétables ; l'effet observé est, comme pour la différenciation des isoenzymes, conditionné par la présence de substances telles que le magnésium ou l'imidazole qui peuvent masquer la véritable influence des ions.

Il est également hasardeux de définir le type d'inhibition observé ; elle est le plus souvent non compétitive avec le substrat mais elle varie avec la concentration ionique : l'étude de l'affinité du dimère BB pour le créatinephosphate en présence de $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ montre que l'inhibition devient compétitive avec $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 0,25 M.

Conclure donc sur la régulation ionique des enzymes in vivo semble délicat : les modifications de l'activité enzymatique ont été obtenues avec des concentrations salines différentes de celles du milieu intérieur et dans des conditions de mesure assez éloignées des conditions physiologiques.

CONCLUSIONS

Les différents sels testés favorisent à faible concentration l'activité de la CPK musculaire tandis qu'ils inhibent l'enzyme à des taux supérieures à 50 millimoles.

L'effet des sulfates et des phosphates sur le dimère BB est identique ; par contre de fortes concentrations de Na Cl permettent de différencier les deux isoenzymes : Na Cl active le dimère BB tandis qu'il inhibe l'activité de la forme MM.

L'inhibition obtenue semble être de nature non compétitive au substrat.

Cependant les conditions des essais in vitro assez éloignées des conditions physiologiques rendent difficile la transposition in vivo des effets observés.

C H A P I T R E X I I I

EFFET DE L'INSULINE SUR L'ACTIVITE IN VITRO DE LA CREATINEPHOSPHOKINASE

Les régulations hormonales et nerveuses qui maintiennent à chaque instant chaque cellule à un niveau d'activité métabolique compatible avec celui des autres, représentent un processus de régulation des activités enzymatiques.

Le mécanisme de ces actions varie-t'il selon la forme moléculaire en cause ? C'est ce que nous avons voulu vérifier en étudiant l'effet de l'insuline sur les isoenzymes de la CPK.

L'insuline contrôle in vivo l'activité d'un grand nombre d'enzymes des métabolismes glucidiques, protidique et lipidique ; mais jusqu'au travail de CONN (108), aucune action directe de l'insuline sur l'activité in vitro des enzymes n'avait pu être mise en évidence.

CONN montra que l'insuline intensifiait l'activité de la CPK musculaire mais il n'observait cet effet que dans la réaction conduisant à la formation de créatine et d'ATP, l'insuline n'agissant pas sur la phosphorylation de la créatine.

HENOUNE et SCHAPIRA (109) reprenant cette observation, testèrent l'insuline vis-à-vis des isoenzymes de la CPK séparées par électrophorèse : ils obtinrent une activation avec le dimère MM et au contraire une nette inhibition avec la forme BB.

SCHNEIDER et DURR (214) enfin n'ont jamais réussi à mettre en évidence un effet de l'insuline sur la CPK musculaire.

Ces données contradictoires nous ont incitée à reprendre l'étude des effets de l'insuline sur les différentes formes de CPK.

A - CONDITIONS OPERATOIRES

Nous avons observé l'effet de l'insuline sur la CPK extraite des broyats de muscle et d'encéphale de souris et de lapin, sur les fractions séparées et purifiées par chromatographie sur DEAE Cellulose ainsi que sur une préparation commerciale de CPK de muscle de lapin.

L'activité enzymatique est mesurée manuellement dans les conditions précédemment décrites.

Les conditions opératoires de CONN (108) diffèrent de celles de SCHNEIDER et DURR (214) ; le premier introduit l'insuline directement dans le milieu tandis que les seconds laissent l'enzyme et l'hormone en contact à 37° avant de faire démarrer la réaction enzymatique.

Nous avons donc testé l'action de l'hormone dans ces deux conditions :

- l'insuline est introduite directement dans la réaction enzymatique (conditions A)
- Précontact à 37° entre l'insuline et la CPK (conditions B)

Conditions A

Mettre en contact 10 minutes à 37°, cinq micromoles de mercaptoéthanol, 2,8 micromoles de créatinephosphate. Ajouter une prise d'essai convenablement diluée de CPK et 0,40 unité d'insuline.

Faire démarrer la réaction par addition de 2 micromoles d'ADP, laisser incuber 10 minutes à 37° et doser la créatine après arrêt de la réaction enzymatique par addition de chloro-4 mercuribenzoate de sodium et déprotéinisation.

Conditions B

Mettre en pré-contact 10 minutes à 37°, 0,4 unité d'insuline et une prise d'essai de CPK.

D'autre part mettre à incuber séparément 2,8 micromoles de créatinephosphate, 5 micromoles de mercaptoéthanol et 2 micromoles d'ADP.

Faire démarrer la réaction en ajoutant le premier mélange au deuxième et opérer comme il a été précédemment décrit.

L'insuline a été aimablement mise à notre disposition par les Laboratoires NOVO; qu'ils en soient remerciés.

RESULTATS

a - Effet de l'insuline introduite directement dans la réaction enzymatique

Les résultats obtenus avec les différentes préparations sont rassemblés dans le tableau 47.

Tableau 47 : Effet de l'insuline sur l'activité de la CPK (conditions A)

Préparations	Nombre d'essais	Moyenne et écarts des % d'activation ou d'inhibition
Broyat musculaire	8	+ 19,5 % (0 à + 35 %)
Enzyme commerciale	14	+ 9,7 % (- 15 % à + 25 %)
Isoenzyme MM séparée par chromatographie	6	+ 2 % (- 15 % à + 20 %)
Broyat d'encéphale	12	- 5 % (- 28 % à + 6 %)
Isoenzyme BB séparée par chromatographie	5	- 9 % (- 54 % à + 15 %)

Les moyennes des activations et des inhibitions ne montrent que de faibles modifications. Mais les variations sont importantes d'un essai à l'autre d'une même série (0 à 35 % d'activation par exemple pour l'enzyme d'un broyat musculaire de souris).

Comme pour l'action des ions, l'instabilité de l'enzyme rend les essais très difficilement interprétables.

Les résultats ne sont pas significatifs : ils ne mettent en évidence qu'une tendance à un effet activateur de l'insuline sur l'enzyme musculaire et à un effet inhibiteur sur l'enzyme du cerveau. Ils sont cependant de même sens que ceux obtenus par HANOUNE et SCHAPIRA (109).

b - Effet de l'insuline après un précontact avec l'enzyme

Dans ces conditions, l'insuline reste en précontact 10 minutes à 37° avec la CPK en l'absence de mercaptoéthanol.

Le tableau 48 rassemblant les résultats obtenus, met en évidence l'effet inhibiteur de l'insuline. L'action est plus marquée avec l'enzyme musculaire mais cette inhibition n'est pas retrouvée pour le dimère MM isolé par chromatographie sur DEAE Cellulose. Ici encore, l'instabilité de l'enzyme conduit à des écarts importants entre les différents essais.

Tableau 48 : Effets de l'insuline sur la CPR (conditions B)

Préparations	Nombre d'essais	Moyenne et écarts des % d'activation ou d'inhibition
Broyat musculaire	16	- 49 % (- 81 % à - 12 %)
Enzyme commerciale	14	- 44,5 % (- 76 % à + 48 %)
Isoenzyme MM chromatographiée	7	+ 7 % (0 à + 16 %)
Broyat d'encéphale	17	- 28 % (- 68 % à + 12 %)
Isoenzyme BB chromatographiée	5	- 10,5 % (- 22 % à + 4 %)

Nous avons étudié plus en détails cet effet inhibiteur de l'insuline.

- Il n'est pas dû à de petites molécules présentes dans le milieu puisqu'il n'est pas modifié par la dialyse préalable de l'enzyme ; après dialyse de broyats musculaires, la moyenne d'inhibition retrouvée après 7 essais reste de -45 %.

- Nous avons également vérifié que l'effet observé n'était pas dû à une réaction secondaire entre l'insuline et les différentes solutions introduites dans le milieu réactionnel : tampon phosphate employé en chromatographie, tampon imidazole utilisé pour la réaction enzymatique,

solution de saccharose 0,25 M dans lequel sont effectués les broyats. L'insuline ne modifie pas non plus la réaction colorée mise en oeuvre pour doser la créatine libérée.

- L'effet inhibiteur reste proportionnel quelle que soit la durée de la réaction enzymatique ; il n'est pas levé par une augmentation du temps d'incubation.

- Nous avons retrouvé d'autre part l'effet inhibiteur de l'insuline sur les broyats musculaires en dosant non pas la créatine libérée mais ATP selon le procédé mis au point par OLIVER (141).

- Les substrats : créatinephosphate ou ADP, ne protègent pas l'enzyme contre l'inhibition. Par contre le mercaptoéthanol est capable de maintenir l'intégrité de l'activité catalytique (tableau 49).

Tableau 49 : Effet de 0,4 U.I. d'insuline sur la CPK commerciale en présence de différents substrats (conditions B).

Substrats	% d'inhibition
Néant	53 %
CPK + mercaptoéthanol	0
CPK + créatinephosphate	50 %
CPK + A.D.P.	36 %

- Nous avons enfin étudié l'action des différentes doses d'insuline (tableau 50).

Tableau 50 : Effet de l'insuline en fonction de la dose (conditions B).

Insuline (Unités Inter- nationales)	0	0,01	0,02	0,04	0,1	0,2	0,4
% d'inhibition	0	8	13	13	16	54	75

On constate que l'inhibition ne se manifeste nettement que pour une concentration finale de 0,2 U.I. Il ne nous a pas été possible d'introduire plus de 0,4 U.I. d'insuline en raison du titre de la préparation que nous avons utilisée.

DISCUSSION

Il serait satisfaisant pour l'esprit qu'une hormone telle que l'insuline réagisse d'abord sur une enzyme limitant un certain processus métabolique dont l'activité modifiée se traduise en second lieu sur d'autres phénomènes physiologiques. L'insuline agit sur de nombreux métabolismes et les chercheurs se demandent s'il sera un jour possible de relier la multiplicité de ces effets à un seul événement primitif qui représentera vraiment l'action de l'hormone (215).

L'hypothèse proposée par CONN (108) d'un effet primaire de l'insuline répondrait à cette théorie : les effets physiologiques de l'insuline (action secondaire) seraient dûs alors à une augmentation de la disponibilité en ATP. Mais cette hypothèse fort peu probable ne semble pas devoir être retenue car elle ne permet pas d'expliquer toutes les actions de l'insuline d'autant plus que CONN affirme, dans une lettre adressée un an après la publication de ses travaux à SCHNEIDER et DURR (214), ne plus retrouver avec une enzyme purifiée par chromatographie sur Sephadex, l'intensification obtenue avec les préparations commerciales. Les effets observés ne seraient dûs en fait qu'à une action secondaire sur un composé présent dans les préparations.

Les résultats de HANOUNE et SCHAPIRA (109) avec les deux isoenzymes de la CPK, présentent par contre un tout autre intérêt : les effets différents observés avec les isoenzymes MM et BB laissent entrevoir une régulation indépendante de ces deux formes moléculaires contrôlant une réaction catalytique unique.

Mais les résultats négatifs de SCHNEIDER et DURR (214) et les nôtres peu significatifs lorsque l'hormone est introduite directement dans le milieu, ne permettent pas de retenir une telle hypothèse pour l'instant.

Quant à l'effet inhibiteur constaté après un précontact enzyme-hormone, il semble dû à une inactivation des groupements SH de l'enzyme puisque le mercaptoéthanol prévient cette inhibition ; cette influence se retrouve aussi bien avec le dimère MM qu'avec l'isoenzyme BB avec cependant une action plus nette sur la CPK musculaire. Mais nous n'avons pas constaté d'effet inhibiteur sur l'isoenzyme isolée par chromatographie.

Les variations observées sont difficilement interprétables en raison de l'instabilité de l'enzyme et il ne semble pas que l'insuline ait un effet direct important sur la CPK.

CONCLUSIONS

Les données de la littérature concernant un effet de l'insuline sur la CPK in vitro sont contradictoires. Nous avons repris l'étude de cet effet sur des préparations plus ou moins purifiées de CPK et suivant deux protocoles opératoires :

1) En introduisant directement l'insuline dans la réaction enzymatique il n'y a que de faibles variations positives avec l'isoenzyme musculaire et négatives avec l'isoenzyme de cerveau, variations qui ne nous semblent pas significatives.

2) En mettant en précontact l'insuline avec de la CPK, l'enzyme est souvent inhibée. Mais ces résultats ne sont pas reproductibles avec fidélité. Le mercaptoéthanol protège l'enzyme contre cette inhibition.

CONCLUSIONS DE LA DEUXIEME PARTIE

La CPK est une enzyme présente dans les organes nécessitant une libération rapide d'énergie : muscle, coeur et à un degré moindre l'encéphale. Elle contrôle la réaction réversible : créatinephosphate + ADP $\rightleftharpoons$ créatine + ATP.

La connaissance de la structure de la CPK a permis de mettre en évidence l'existence de trois isoenzymes : les dimères MM, MB et BB.

Nous avons défini les conditions de dosage de l'enzyme en mesurant la créatine libérée après hydrolyse du créatinephosphate en présence d'ADP et de mercaptoéthanol.

La réaction est développée dix minutes à 37° dans un milieu tampon imidazole - acétate de magnésium (pH = 6,8) en présence de 2,8 micromoles de créatine phosphate, 2 micromoles d'ADP et 5 micromoles de mercaptoéthanol.

L'activité enzymatique est stoppée par addition de 9 micromoles de chloro-4 mercuribenzoate de sodium et les protéines sont éliminées par défécation barytique.

La créatine libérée est dosée dans le surnageant avec le dioxo-2,3 butane, l'orcinol et la glucuronolactone en milieu alcalin.

Les conditions retenues permettent un dosage sensible et spécifique de la CPK.

L'adaptation de la technique à l'analyse en flux continu conduit à une méthode encore plus sensible mais dont il faut contrôler la spécificité par un témoin réactif.

Nous avons également mis au point deux procédés de séparation des formes moléculaires de CPK par électrophorèse sur acétate de cellulose et par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de DEAE Cellulose.

Dans les deux cas, l'activité enzymatique est révélée avec la méthode de mesure de l'activité globale de la CPK.

Nous avons pu ainsi séparer les 3 formes moléculaires de CPK. Par ordre de migration électrophorétique croissante, on distingue les dimères MM, MB et BB.

En chromatographie la séparation s'effectue dans le même ordre ; le dimère MM passe rapidement tandis que la forme BB, fortement retenue par l'échangeur n'est éluee que par augmentation de la force ionique et baisse du pH.

Le premier procédé, rapide, sensible et spécifique est bien adapté à l'étude de la CPK sérique : il nécessite peu de produit biologique, ne demande pas de matériel très spécialisé et répond aux exigences de la clinique.

Quant à la chromatographie, elle a valeur de méthode préparative et permet le recueil de fractions séparées et purifiées, avec lesquelles nous avons tenté de préciser les mécanismes de régulation de l'activité enzymatique ou les interactions insuline-enzyme.

La régulation de l'activité des enzymes par de petites molécules d'effecteurs allostériques ou par action hormonale mise en évidence au cours de ces dernières années, a permis de différencier les formes moléculaires multiples de certaines enzymes. Nous avons vérifié ces données avec la CPK en étudiant l'effet des sels et de l'insuline.

Parmi les sels testés, seul NaCl à une concentration supérieure à 100 millimoles permet de différencier les formes moléculaires de CPK : nous avons observé une intensification de l'activité du dimère BB tandis que le forme MM est inhibée.

L'action de l'insuline varie selon qu'elle est introduite directement dans la réaction enzymatique ou qu'elle reste en précontact avec l'enzyme. Dans le premier cas, il n'y a que de faibles variations : mais dans le deuxième cas, la CPK est pratiquement toujours inhibée, avec un effet plus marqué pour le dimère MM.

Les conditions strictes du dosage in vitro de l'activité de la CPK (présence de magnésium, de tampon imidazole), et l'instabilité très marquée de l'enzyme, rendent délicate l'interprétation des variations observées et ne nous permettent pas une transposition in vivo des effets obtenus.

Annexe I : TECHNIQUE DE MESURE DE L'ACTIVITE DE LA CPK SERIQUE

REACTIFS

I : Solution tampon pH = 6,8

. Imidazole(Merck).....	13,6 g
. Acétate de magnésium, 4 H ₂ O(Merck).....	4,3 g
. Eau distillée	800 ml

Ajuster à pH = 6,8 avec CH₃ - COOH. Compléter au litre.
Conserver à température ordinaire.

II : Solution de mercapto-2 éthanol (Fluka)

. Mercapto-2 éthanol (Fluka).....	0,1 ml
. Tampon	50 ml

Préparation extemporanée.

III : Substrat

. Créatinephosphate, sel de sodium(Sigma)	0,2375 g
. Tampon	12,5 ml
. Eau distilléeq.s.p.	50 ml

Conserver à + 4° par fraction de 0,2 ml dans les tubes
à centrifuger utilisés pour le dosage.

IV : Solution d'adénosine diphosphate

. ADP sel de sodium	0,266 g
. Tampon	25 ml
. Eau distilléeq.s.p.	50 ml

Conserver à + 4°

V : Solution de chloro-4 mercuribenzoate de sodium 0,03 M

. Chloro-4 mercuribenzoate de sodium(Fluka)	1,13 g
. NaOH N q.s.p. dissoudre (environ	5 ml)
. Eau distilléeq.s.p.	100 ml

Conserver à + 4°

VI : Solution de baryte 0,34 N

. Ba (OH) ₂ , 8 H ₂ O R.P.....	5,36 g
. Eau distillée	q.s.p.100 ml

Agiter - Filtrer - Equilibrer avec le réactif VII.

VII : Solution de sulfate de zinc R.P. à 5 g p. 100

VIII : Solution stock de dioxo-2,3 butane (diacétyl) 0,1 M

. Dioxo-2,3 butane	0,86 g
. Eau distillée	q.s.p.100 ml

Conserver à + 4° en flacon brun

IX : Solution de dioxo-2,3 butane 0,005 M obtenue par dilution au 1/20è dans l'eau distillée de la solution stock.

Préparation extemporanée.

X : Réactif orcinol - glucuronolactone

. Dihydroxy-3,5 toluène (orcinol)	0,62 g
. Glucuronolactone	0,45 g
. Eau distillée	q.s.p.100 ml

Conservation 6 mois en flacon brun à + 4°

XI : Na OH 1,5 N

XII : Solution stock de créatine 0,01 M

. Créatine anhydre(Merck).....	0,1311 g
. Eau distillée	q.s.p. 100 ml

Conserver à + 4°

XIII : Solutions étalons de créatine à 1 et 5 micromoles par ml obtenues par dilution extemporanée au 1/10è et 1/2 dans l'eau distillée de la solution stock.

TECHNIQUE

		Témoïn	Etalon 0,1 Micromoles	Etalon 0,5 Micromoles	Dosage
Créatine phosphate (R.III)	ml	0,2	0,2	0,2	0,2
Mercapto-2 éthanol (R.II)	ml	0,2	0,2	0,2	0,2
Eau distillée	ml	0,1			
Solution étalon de créatine (1 uM/ml) (R. XIII)	ml		0,1		
Solution étalon de créatine (5 uM/ml (R. XIII)	ml			0,1	
Sérum	ml				0,1
Mettre au bain-marie à 37° C : 5 minutes. Pipeter à 60 secondes d'intervalle.					
Adenosine diphosphate (R. IV)	ml	0,2	0,2	0,2	0,2
Bain-marie 37°C : 10 minutes exactement pour chaque tube. Ajouter à 60 secondes d'intervalle dans chaque tube :					
Chloro-4 mercuribenzoate					
0,03 M (R. V)	ml	0,3	0,3	0,3	0,3
Baryte (R. VI)	ml	2	2	2	2
Eau distillée	ml	5	5	5	5
Sulfate de Zinc (R. VII)	ml	2	2	2	2
Mélanger après chaque addition. Attendre 10 minutes. Agiter. Centrifuger pendant 5 minutes.					
Surnageant	ml	3	3	3	3
Dioxo-2,3 butane 0,005 M (R. IX)	ml	1	1	1	1
Réactif orcinol-glucuro- nolactone (réactif X)	ml	1	1	1	1
NaOH 1,5 N	ml	1	1	1	1

Porter au bain-marie 37°C : 10 minutes.
Refroidir 10 minutes. Lire à 520 nm.

Annexe II : SEPARATION ELECTROPHORETIQUE DES ISOENZYMES DE LA
CREATINEPHOSPHOKINASE

REACTIFS

I : Solution tampon pH = 8,6 force ionique 0,05 pour
électrophorèse

. Véronal	1,34 g
. Véronal sodé	10,30 g
. Eau distillée	q.s.p. 1000 ml

Conserver à + 4° C

II : Bandes d'acétate de cellulose gélatineux (Cellogel)
largeur 2,5 cm ou 4 cm.

III : Solution tampon pH = 6,8

. Imidazole Merck	13,6 g
. Acétate de magnésium, 4 H ₂ O (Merck)	4,3 g
. Eau distillée	q.s.p. 800 ml

Ajuster à pH = 6,8 à 25° avec de l'acide acétique
glacial. Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.
Conserver à température ordinaire

IV : Solution de créatine-phosphate

. Créatinephosphate, sel de sodium	0,095 g
. Tampon (réactif III)	2,5 ml
. Eau distillée	q.s.p. 7,5 ml

Conserver à + 4° C

V : Solution d'Adénosine diphosphate

. ADP sel de sodium	0,266 g
. Tampon (réactif III)	25 ml
. Eau distillée	q.s.p. 50 ml

Conserver à + 4° C

VI : Solution de mercapto-2 éthanol

. Mercapto-2 éthanol (Fluka)	0,1 ml
. Tampon (réactif III)	50 ml

Préparation extemporanée.

VII : Réactif - substrat

. Créatinephosphate (réactif IV)	0,3 ml
. ADP (réactif V)	0,4 ml
. Mercapto-2 éthanol (réactif VI)	0,2 ml

Préparation extemporanée.

VIII : Solution de ninhydrine 0,02 M

. Ninhydrine Merck	0,356 g
. Alcool absolu R.P.....	q.s.p. 100 ml

IX : Solution de KOH à 40 g %

MODE OPERATOIRE

- Electrophorèse

Déposer à un centimètre du bord cathodique de la bande d'acétate de cellulose gélatineux préalablement plongée dans le tampon de pH = 8,6, 20 microlitres de sérum.

Faire migrer pendant 90 minutes à 150 volts (1 mA/cm).

Si possible réaliser toutes les opérations à + 4°C.

- Révélation

Placer la bande dans une boîte de Pétri et l'imprégner de substrat (réactif VII). Recouvrir avec une bande de papier à électrophorèse (pour éviter une évaporation importante) et placer 10 minutes à l'étuve à 37°.

Remplacer le papier par une bande d'acétate préalablement plongée pendant 5 minutes dans la solution de ninhydrine.

Après 2 à 3 minutes de contact, remplacer par un papier trempé dans la solution de potasse.

Examiner immédiatement la fluorescence en lumière de Wood.

CONCLUSIONS GENERALES

L'étude des réactions colorées des dérivés guanidiques et des alpha-dicétones que nous avons envisagée dans la première partie de ce travail, a montré que parmi les dicétones essayées trois réagissaient avec les guanidines : le dioxo-2,3 butane, le dioxo-2,3 phényl-3 propane et le dioxo-2,3 pentane. Jusqu'à présent la première était pratiquement la seule utilisée.

Ces réactions s'apparentant à celles des dérivés carbamidés développées en milieu acide, nous avons tenté d'améliorer leur sensibilité en introduisant dans le milieu réactionnel, des composés testés en milieu acide.

Peu de dérivés réagissent en milieu alcalin mais en remplaçant l'alpha-naphtol par l'orcinol et la lactone de l'acide glucuronique, nous avons doublé la sensibilité des réactions.

Nous avons défini les meilleures conditions de réactivité de chaque dicétone que nous avons ensuite adaptées à l'analyse en flux continu. Les résultats sont très voisins ; mais la comparaison des trois réactions a montré que celle du dioxo-2,3 butane faisait appel à des réactifs stables et qu'elle était la plus sensible. Cependant elle reste toutefois un peu moins spécifique que celle du dioxo-2,3 pentane.

Ces données nous ont conduit à choisir la réaction créatine-dioxo-2,3 butane pour l'appliquer dans une deuxième partie, à l'étude de la CPK.

Notre travail a été poursuivi avec deux objectifs : l'un de biochimie appliquée au domaine médical, l'autre de biochimie générale.

Pour répondre au premier but de notre étude, nous avons défini de nouvelles conditions de mesure de l'activité enzymatique qui conduisent à un dosage sensible et spécifique de la CPK.

La CPK est dosée en mesurant dans les conditions précédemment définies la créatine libérée par l'hydrolyse du créatinephosphate en présence d'ADP et de mercaptoéthanol.

L'enzyme est présente dans les tissus musculaires, en particulier le myocarde, et dans l'encéphale ; tout l'intérêt du dosage réside dans cette localisation particulière : toute augmentation de l'activité sérique étant le signe d'une nécrose des tissus musculaires ou nerveux presque exclusivement.

Mais l'étude de la CPK nous a également fait aborder les mécanismes de régulation de l'activité enzymatique in vitro.

La connaissance de la structure et des propriétés de la CPK a en effet mis en évidence l'existence de formes moléculaires multiples : les dimères MM, MB, BB. La forme MM est présente dans les tissus musculaires, le dimère BB se retrouve principalement dans l'encéphale et l'hybride MB dans le myocarde.

Le rôle de ces enzymes isofonctionnelles est encore mal connu mais elles semblent permettre une régulation différentielle par des effecteurs ioniques ou allostériques.

La séparation des formes moléculaires de CPK par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE Cellulose nous a permis de disposer de fractions purifiées pour étudier ces différents mécanismes de régulation.

L'étude de l'effet des sels a révélé que NaCl à des concentrations égales ou supérieures à 100 millimoles intensifiait l'activité du dimère BB tandis que l'isoenzyme musculaire était inhibée. Avec les autres sels, les variations sont identiques pour les deux isoenzymes.

L'insuline introduite directement dans la réaction enzymatique ne provoque pas de variations significatives de l'activité de la CPK tandis que l'on observe une inhibition après un pré-contact insuline-CPK. Cet effet, levé en présence de mercaptoéthanol est dû à l'inactivation des groupements thiol de la CPK indispensable à l'activité enzymatique.

En fait, les différentes formes de CPK ne semblent pas soumises in vitro à une régulation ionique ou hormonale. Cependant nos résultats sont perturbés par l'instabilité de l'enzyme et par la présence de sels ou de tampon nécessaires à l'activité enzymatique in vitro.

Quel est alors le processus de régulation in vivo ?

Quelle est la finalité des isoenzymes de la CPK ?

Des études parallèles sur d'autres mécanismes cellulaires, des expériences in vivo ou peut-être l'histologie, la cytologie et l'immunologie permettront certainement de donner une réponse à ces questions dans un avenir que nous souhaitons proche.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - SIEST (G)
Thèse Pharmacie. Nancy. 1966
- 2 - VOGES (O) et PROSKAUER (B)
Z. Hygiène. 1898, 28, 20-32
- 3 - HARDEN (A)
Proceed. Roy. Soc. 1905, 77, 424 - 425
- 4 - HARDEN (A) et NORRIS (D)
J. Physiol. 1911, 42, 332 - 336
- 5 - O'MEARA (R.A.Q.)
J. Path. Bact. 1931, 34, 401 - 403
- 6 - BARRITT (M.M.)
J. Path. Bact. 1936, 42, 441-454
- 7 - WESTERFELD (W.W)
J. Biol. Chem. 1945, 161, 495-502
- 8 - WALPOLE (G)
J. Physiol. 1911, 42, 301-308
- 9 - EGGLETON (P) et EGGLETON (G.M)
J. Physiol. 1928, 65, 15-24
- 10 - DULIERE (W)
Biochem. J. 1929, 23, 921 - 926
- 11 - EGGLETON (P), ELSDEN (S.R) et GOUGH (N)
Biochem. J. 1943, 37, 526-529
- 12 - RAAFLAUB (J) et ABELIN (I)
Biochem. Z. 1950, 321, 158-165
- 13 - ENNOR (A.H) et STOCKEN (L.A)
Biochem. J. 1953, 55, 310-314
- 14 - ROSENBERG (H), ENNOR (A.H) et MORRISON (J.F)
Biochem. J. 1956, 63, 153-159
- 15 - ENNOR (A.H) et STOCKEN (L.A)
Biochem. J. 1948, 42, 557-563
- 16 - GRIFFITHS (W.J)
Clin. Chim. Acta. 1964, 9, 210-213

- 17 - GERBER (G.B), GERBER (G) et ALTAMM (K.I)
Anal. Chem. 1961, 33, 852-853
- 18 - ANDERSON (D.R), WILLIAMS (C.M), KRISE (G.M) et DOWBEN (R.M)
Biochem. J. 1957, 67, 258-262
- 19 - KUROHARA (S.S)
Clin. Chem. 1961, 7, 284-288
- 20 - KANIG (K)
Z. Physiol. Chem. 1957, 306, 247-259
- 21 - LAUBER (K)
Z. Klin. Chem. 1966, 3, 119-122
- 22 - ROCHE (J), VAN THOAI (N) et HATT (J.L)
Biochim. Biophys. Acta. 1954, 14, 71
- 23 - GARCIA (I) et COUERBE (J)
Bull. Soc. Chim. Biol. 1956, 38, 791-799
- 24 - ROSENBERG (H)
Biochem. J. 1959, 72, 582-585
- 25 - PANT (R) et DUBEY (S.S)
Biochim. Biophys. Acta. 1960, 41, 536
- 26 - SMITH (I)
Chromatographic and électrophoretic Techniques.
Interscience Publishers - NEW YORK. 1960, 1, Chromat. 222-230
- 27 - ROBIN (Y) et VAN THOAI (N)
Bull. Soc. Chim. Fr. 1967, 10, 3965-3971
- 28 - SPECKMAN (R.A) et COLLINS (E.B)
Anal. Biochem. 1968, 22, 154-160
- 29 - MENAGE (A), TEMPE (J) et MOREL (G)
Physiol. Veg. 1966, 4, 317-322
- 30 - LANG (K)
Z. Physiol. Chem. 1932, 208, 273-280
- 31 - IRREVERRE (F) et EVANS (R.L)
J. Biol. Chem. 1959, 234, 1438-1440
- 32 - FAURE (F)
Bull. Soc. Chim. Biol. 1956, 38, 1173-1183

- 33 - FAURE (F)
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 1959, 98, 187-200
- 34 - CONN (R.B) et DAVIS (R.B)
Nature. 1959, 183, 1053-1055
- 35 - CONN (R.B)
Clin. Chem. 1960, 6, 537-539
- 36 - CHAPPELL (J.B) et PERRY (S.V)
Biochem. J. 1954, 57, 421-434
- 37 - SOLVONUK (P.F), McRAE (S.C) et COLLIER (H.B)
Canad. J. Biochem. Physiol. 1956, 34, 481-487
- 38 - DREYFUS (J.C) et SCHAPIRA (G)
Rev. Franc. Et. Clin. Biol. 1961, 6, 700-703
- 39 - ROZBERG (R)
Acta. Clin. Belgica. 1962, 17, 392-405
- 40 - HUGHES (B.P)
Clin. Chim. Acta. 1962, 7, 597-603
- 41 - NICHOL (C.J)
Canad. J. Biochem. 1964, 42, 243-249
- 42 - SIEGEL (A.L) et COHEN (P.S)
Technicon Symposium - Automation in Analytical
Chemistry. 1966, 474-476
- 43 - FLEISCHER (G.A)
Clin. Chem. 1967, 13, 233-241
- 44 - MENACHE (R) et GAIST (L)
Bull. Soc. Ital. Biol. Sper. 1967, 43, 39-41
- 45 - STERBA (S) et DURAFFOURD (P)
Coeur et Médecine Interne. 1968, 7, 151-155
- 46 - CHARLOT (G)
Théorie et méthode nouvelle d'analyse qualitative.
MASSON, Editeurs PARIS. 1949
- 47 - DICKENMAN (R.C), CRAFTS (B) et ZAK (B)
Am. J. Clin. Path. 1954, 24, 981-987
- 48 - CHANG (Y.J) et PINSON (R)
Biochem. Pharmacol. 1967, 16, 201-207

- 49 - KRONEBERG (G), SCHLOSSMANN (K) et STOEPEL (K)
Arzneimittel Forschung. 1967, 17, 199-207
- 50 - SAX (S.M) et MOORE (J.I)
Clin. Chem. 1965, 11, 951-958
- 51 - CONN (R.B) et ANIDO (V)
Amer. J. Clin. Pathol. 1966, 46, 177-184
- 52 - WILLIS (C.E), NOSAL (T) et KING (J.W)
Technicon Symposium. 1967, 1, 579-582
- 53 - TOI (K), BYNUM (E), NORRIS (E) et ITANO (H.A)
J. Biol. Chem. 1965, 240, 3455-3457
- 54 - NAKAYA (K), HORINISHI (H) et SHIBATA (K)
J. Biochem. 1967, 61, 337-344
- 55 - TEMPE (J), MENAGE (A) et MOREL (G)
Technicon Symposium - Automation in Analytical Chemistry.
1966. 11, 421-425
- 56 - PECHMANN Von (H)
Berichte. 1888, 21, 1411
- 57 - JOB (P)
Ann. Chem. 1928, 9, 113
- 58 - LAZARE (J)
Thèse Pharm. Nancy. 1959
- 59 - YAMADA (S) et ITANO (H.A)
Biochim. Biophys. Acta. 1966, 130, 538
- 60 - FAURE (F) et BLANQUET (M.P)
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 1961, 100, 105-119
- 61 - FAURE (F) et BLANQUET (P)
Clin. Chim. Acta. 1964, 9, 292-300
- 62 - COHN (V.H) et SHORE (P.A)
Anal. Biochem. 1961, 2, 237-241
- 63 - SCHLOSSMANN (K)
Arzneimittel Forschung. 1967. 17, 234-235
- 64 - NOTENBOOM (C.D), VAN DE VEERDONK (F.C.G) et VAN DE KAMER (J.C)
Histochemie. 1967, 9, 117-121

- 65 - MARKERT (C.L) et MOLLER (F)
Proc. Natl. Acad. Sci. 1959, 45, 753-763
- 66 - LOHMANN (H)
Biochem. Z. 1934, 27, 264-277
- 67 - LEHMANN (H)
Biochem. Z. 1935, 281, 271-291
- 68 - BANGA (I)
Stud. Inst. Med. Chem. Szeged. 1943, 3, 59-63
- 69 - DAWSON (D.M) EPPENBERGER (H.M) et KAPLAN (N.O)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1965, 21, 346-353
- 70 - DREYFUS (J.C) et ALLARD (D)
C.R. Acad. Sci. Paris. 1968, 266, 167-169
- 71 - KUBY (S.A), NODA (L) et LARDY (H.A)
J. Biol. Chem. 1954, 209, 191-201
- 72 - NODA (L), KUBY (S.A) et LARDY (H.A)
J. Biol. Chem. 1954, 209, 203-210
- 73 - KUBY (S.A), NODA (L) et LARDY (H.A)
J. Biol. Chem. 1954, 210, 65-81
- 74 - ENNOR (A.H) et ROSENBERG (H)
Biochem. J. 1954, 57, 203-212
- 75 - NARAYANASWAMI (A)
Biochem. J. 1952, 52, 295-301
- 76 - WOOD (T)
Biochem. J. 1963, 87, 453-462
- 77 - DAWSON (D.M), EPPENBERGER (H.M) et KAPLAN (N.O)
J. Biol. Chem. 1967, 242, 210-217
- 78 - DAWSON (D.M) et FINE (T.H)
Archiv. Neurology. 1967, 16, 175-180
- 79 - STEIN (P) et LAMPRECHT (W)
Klin. Wschr. 1962, 40, 177-179
- 80 - KLEINE (T.O)
Clin. Chim. Acta, 1965, 11, 82-85

- 81 - PARK (D.C) et PENNINGTON (R.J)
Clin. Chim. Acta. 1966, 13, 694-700
- 82 - CHAPPEL (J.B)
Brit. Med. Bull. 1968. 1968, 24, 150-157
- 83 - SWANSON (P.D)
Neurology. 1966, 16, 315-315
- 84 - KLEINE (T.O)
Klin. Wschr. 1965, 43, 504-510
- 85 - SULLIVAN (R.J), NEAL MILLER (O), SELLINGER (O.Z)
J. Neurochem. 1968, 15, 115-121
- 86 - JACOBS (H), HELT (H.W) et KLINGENBERG (M)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1964, 16, 516-521
- 87 - OTTAWAY (J.H)
Nature. 1967, 215, 521-522
- 88 - KLEINE (T.O)
Nature. 1965, 207, 1393-1394
- 89 - BESSMAN (S.P) et FONYO (A)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1966, 22, 597-602
- 90 - SWANSON (P.D)
J. Neurochemistry. 1967, 14, 343-356
- 91 - GEIGER (W.B)
J. Biol. Chem. 1956, 220, 871-877
- 92 - NODA (L), KUBY (S) et LARDY (H)
in : COLOWICK (S.P), KAPLAN (N.O) : Methods in Enzymology
Academic Press Inc. Editeurs. NEW-YORK. 1955
- 93 - EPPENBERGER (H.M), DAWSON (D.D) et KAPLAN (N.O)
J. Biol. Chem. 1967, 242, 204-209
- 94 - OKINAKA (S), SUGITA (H), MOMOI (H), TOYOKURA (Y), WATANABE (T)
EBASHI (F) et EBASHI (S)
J. Lab. Clin. Med. 1964, 64, 299-305
- 95 - ASKONAS (B.A)
Biochem. J. 1951, 48, 42-49

- 96 - CHETVERIKOVA (E.P), KRINSKAJA (A.V), RIBINA (V.V), ALIEVSKAJA (L.L)
ROSANOVA (N.A) et MIRONOV (G.P)
Résumé des Communications F.E.B.S. Prague. 1968
- 97 - YUE (R.H), PALMIERI (R.H), OLSON (O.E) et KUBY (S.A)
Biochem. 1967, 6, 3024-3227
- 98 - WOOD (T)
Biochem. J. 1963, 89, 210-229
- 99 - MORRISON (J.F) et WHITE (A)
European J. Biochem. 1967, 3, 145-152
- 100 - NODA (L), NIHEI (T) et MORALES (M.F)
J. Biol. Chem. 1960, 235, 2830-2834
- 101 - MORRISON (J.F), O'SULLIVAN (W.J) et OGSTON (A.G)
Biochim. Biophys. Acta. 1961, 52, 82-96
- 102 - RABIN (B.R) et WATTS (D.C)
Nature. 1960, 188, 1163-1165
- 103 - HOOTON (B.T)
Biochem. 1968, 7, 2063-2071
- 104 - ROTTHAUWE (H.W) et KOWALEWSKI (S)
Klin. Wschr. 1967, 45, 387-389
- 105 - NIHEI (T), NODA (L) et MORALES (M.F)
J. Biol. Chem. 1961, 236, 3203-3209
- 106 - OLIVER (I.T)
Biochim. Biophys. Acta. 1954, 14, 587-588
- 107 - ROSALKI (S.B)
J. Lab. Clin. Med. 1967, 69, 696-705
- 108 - CONN (R.B)
Nature. 1966, 211, 196
- 109 - HANOUNE (J) et SCHAPIRA (F)
C.R. Sc. Soc. Biol. 1966, 160, 1807-1809
- 110 - ASKONAS (B.A)
Nature. 1951, 167, 933-934
- 111 - MAHOWALD (T.A)
Biochem. 1965, 4, 732-739

- 112 - DANCE (N) et WATTS (D.C)
Biochem. J. 1962, 84, 114-115
- 113 - FRIEDBERG (E)
Archiv. Biochem. Biophys. 1956, 61, 263-266
- 114 - NOLTMANN (E.A), MAHOWALD (T.A) et KUBY (S.A)
J. Biol. Chem. 1962, 237, 1146-1154
- 115 - THOMSON (A.R), EVELEIGH (J.W) et MILES (B.J)
Nature. 1964, 203, 267-269
- 116 - DACOSTA (W.A) et FRIEDBERG (F)
J. Biol. Chem. 1960, 235, 3134-3137
- 117 - FLOYD (B.F) et FRIEDBERG (F)
J. Biol. Chem. 1967, 242, 1027-1029
- 118 - WATTS (D.C), RABIN (B.R) et CROOK (E.M)
Biochim. Biophys. Acta. 1961, 48, 380-388
- 119 - MAHOWALD (T.A), NOLTMANN (E.A) et KUBY (S.A)
J. Biol. Chem. 1962, 237, 1535-1548
- 120 - PADIEU (P) et MOMMAERTS (W.H.F.M)
Biochim. Biophys. Acta. 1960, 37, 72-77
- 121 - BENESCH (R.E), LARDY (H.A) et BENESCH (R)
J. Biol. Chem. 1955, 216, 663-676
- 122 - KASSAB (R), PRADEL (L.A), DER TERROSSIAN (E) et THOAI (N.V)
Biochim. Biophys. Acta. 1967, 132, 347-360
- 123 - HOOTON (B.T) et WATTS (D.C)
Biochem. J. 1966, 100, 637-646
- 124 - WATTS (B.C)
Biochem. J. 1963, 89, 220-229
- 125 - WATTS (D.C), RABIN (B.R) et CROOK (E.M)
Biochem. J. 1962, 82, 412-417
- 126 - EPPENBERGER (H.M)
Résumé des Communications F.E.B.S. Prague. 1968
- 127 - CHO (A.K), HASLETT (W.L) et JENDEN (D.J)
Biochem. J. 1960, 75, 115-119

- 128 - EBASHI (S), TOYOKURA (Y), MOMOI (H) et SUGITA (H)
Biochem. J. 1959, 46, 103-104
- 129 - OKINAKA (S), KUMAGAI (H), EBASHI (S), SUGITA (H), MOMOI (H)
TOYOKURA (Y) et FUJIE (Y)
Archiv. Neurol. 1961, 4, 520-525
- 130 - TANZER (M.L) et GILVARG (C)
J. Biol. Chem. 1959, 234, 3201-3204
- 131 - ROTTHAUME (H.W), ZURUKZOGLU-SKALAWOUNOU (S) et HAMMANN (H)
Klin. Wschr. 1961, 39, 1269-1275
- 132 - COLOMBO (J.P), RICHTERICH (R) et ROSSI (E)
Klin. Wschr. 1962, 40, 37-44
- 133 - STICH (W) et TSIRIMBAS (A)
Klin. Wschr. 1962, 40, 115-116
- 134 - BERNT (E) et BERGMAYER (H.U)
in BERGMAYER (H.U) : Methods of enzymatic analysis
Academic Press. New-York - London. Edit. 1965
- 135 - RICHTERICH (R)
in Klinische Chemie : Théorie und Praxis Academische
Verlagsgesellschaft - Frankfurt a/Main. Edit. 1965
- 136 - RUDOLPH (N) et GROSS (R.T)
Pediatrics. 1966, 38, 1039-1045
- 137 - FERAUDI (M) et HARM (K)
Z. Klin. Chem. 1967, 5, 270-273
- 138 - NUTTALL (F.Q) et WEDIN (D.S)
J. Lab. Clin. Med. 1966, 68, 324-332
- 139 - KIBRICK (A.C) et MILHORAT (A.T)
Clin. Chim. Acta. 1966, 14, 201-206
- 140 - KORNBERG (A)
J. Biol. Chem. 1950, 182, 779-793
- 141 - OLIVER (I.T)
Biochem. J. 1955, 61, 116-122
- 142 - NIELSEN (L) et LUDVIGSEN (B)
J. Lab. Clin. Med. 1963, 62, 159-168
- 143 - HESS (J.W), MacDONALD (R.P), NATHO (G.J.W) et MURDOCK (K.J)
Clin. Chem. 1967, 13, 994-1005

- 144 - SJÖVALL (K)
Histochemie. 1967, 10, 336-340
- 145 - SCHAPIRA (F)
C.R. Acad. Sci. Paris. 1966, 262, 2291-2293
- 146 - ROSENBERG (H) et ENNOR (A.H)
Biochim. Biophys. Acta. 1955, 17, 261-267
- 147 - KIRK (J.E)
J. Gerontology. 1962, 17, 369-372
- 148 - SCHAPIRA (F) et DREYFUS (J.C)
Ann. Biol. Clin. 1964, 22, 349-355
- 149 - KAR (N.C) et PEARSON (C.M)
Soc. Exp. Biol. Med. 1965, 118, 662-664
- 150 - NICHOL (C.J)
Clin. Chim. Acta. 1965, 11, 404-407
- 151 - THOMPSON (M.W), MURPHY (E.G) et McALPINE (P.J)
J. Pediatrics. 1967, 71, 82-93
- 152 - GRAIG (F.A), SMITH (J.C) et FOLDES (F.F)
Clin. Chim. Acta. 1967, 15, 107-111
- 153 - PRESTON (J.A), BATSAKIS (J.G), BRIERE (R.O) et TAYLOR (R.V)
Am.J. Clin. Pathol. 1965, 44, 71-76
- 154 - CASEY (A.E), GILBERT (F.W), RATLIFF (C.R) et DOWNEY (E)
Alabama J. Med. Sci. 1968, 5, 474-476
- 155 - GRIFFITHS (P.D)
J. Clin. Pathol. 1964, 17, 56-57
- 156 - BAUMANN (P), ESCHER (J) et RICHTERICH (R)
Schweiz Z. Sport. Med. 1962, 10, 33-50
- 157 - SWAMAN (K.F) et AWAD (E.A)
Neurology. 1964, 14, 977-980
- 158 - VEJJAJIVA (A) et TEASDALE (G.M)
Brit. Med. J. 1965, 1, 1653-1654
- 159 - PEARCE (J)
Brit. Med. J. 1965, 3, 169-170

- 160 - HUDGSON (T), GARDNER-MEDWIN (D), PENNINGTON (R.J.T) et WALTON (J.N)
J. Neurol. 1967, 30, 416-419
- 161 - GRIFFITHS (P.D)
Clin. Chim. Acta. 1966, 13, 413-420
- 162 - KONTTINEN (A) et PYORALA (T)
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1963, 15, 419-435
- 163 - EMERY (E.H) et PASCASIO (F.M)
Am. J. Obstetrics Gynecology. 1965, 91, 18-22
- 164 - FLEISHER (G.A), McCONAHEY (W.M) et PANKOW (M)
Mayo. Clin. Proc. 1965, 40, 300-311
- 165 - AMELUNG (D), HOFMANN (L) et OTTO (L)
German Med. Monthly. 1966, 11, 364-366
- 166 - ROTTHAUWE (H.W) et CERQUEIRO (M)
Klin. Wschr. 1963, 41, 876-878
- 167 - ROTTHAUWE (H.W) et KOWALEWSKI (S)
Klin. Wschr. 1967, 45, 387-389
- 168 - KILIMNIK (L)
Acta Clin. Belgica. 1965, 20, 183-194
- 169 - DREYFUS (J.C), SCHAPIRA (G) et DEMOS (J)
Rev. Franc. Et. Clin. Biol. 1960, 5, 384-386
- 170 - AEBI (U), RICHTERICH (R), COLOMBO (J.P) et ROSSI (E)
Enzymol. Biol. Clin. 1961,1962. 1, 61-74
- 171 - FRICK (E)
Klin. Wschr. 1967, 45, 973-977
- 172 - GOTO (I), PETERS (H.A) et REESE (H.H)
Archiv.Neurol. 1967, 16, 529-535
- 173 - LANGTON (L), MOXON (C.P), RIDDOCH (D), WESTHEAD (R.A) et WOOLF (A.L)
Lancet. 1967, 5, 278-281
- 174 - SCHULLER (E)
Presse Med. 1968, 76, 2273-2274
- 175 - MELTZER (H)
Sciences. 1968, 159, 1368-1370

- 176 - GRAIG (F.A) et ROSS (G)
Metabolism. 1963, 12, 57-58
- 177 - GRAIG (F.A) et SMITH (J.C)
J. Clin. Endoc. Metabolism. 1965, 25, 723-731
- 178 - GUYOTJEANNIN (Ch)
Pharmacien Biologiste. 1967, 5, 55-57
- 179 - ESHCHAR (J) et ZIMMERMAN (H.J)
Am. J. Med. Sci. 1967, 253, 272-282
- 180 - NIVET (M), CONSTANS (C) et FACQUET (J)
Rev. Franc. Et. Clin. Biol. 1963, 8, 74-79
- 181 - BRODY (I.A), HATCHER (M.A) et DURHAN (N.C)
Archiv. Neurol. 1967, 16, 89-93
- 182 - VELEZ- GARCIA (E), HARDY (P), DIOSO (M) et PERKOFF (G.T)
J. Lab. Clin. Med. 1966, 68, 636-645
- 183 - BUGER (A), EPPENBERGER (M), WIESMANN (U) et RICHTERICH (R)
Helvetica Physiol. Pharmacol. Acta. 1963, 21, C.R. 6-10
- 184 - SJÖVALL (K) et VOIGT (A)
Nature. 1964, 202, 701-701
- 185 - ROSALKI (S.B)
Nature. 1965, 207, 414-414
- 186 - SHERWIN (A.L), SIBER (G.R) et EILHILALI (M.M)
Clin. Chim. Acta. 1967, 17, 245-249
- 187 - VAN DER VEEN (K.J) et WILLEBRANDS (A.F)
Clin. Chim. Acta. 1966, 13, 312-316
- 188 - TRAINER (T.D) et GRUENIG (D)
Clin. Chim. Acta. 1968, 21, 151-154
- 189 - MENACHE (R), RUBINSTEIN (I), GAIST (L) et MARZIUK (I)
Clin. Chim. Acta. 1968, 19, 33-35
- 190 - BURGER (A), RICHTERICH (R) et AEBI (H)
Biochem. Z. 1964, 339, 305-314
- 191 - DEUL (D.H) et VAN BREEMEN (J.F.L)
Clin. Chim. Acta. 1964. 10, 276-283

- 192 - VASSELLA (F), RICHTERICH (R) et ROSSI (E)
Pediatrics. 1965, 35, 322-330
- 193 - FOCANT (B)
Archiv. Intern. Physiol. Biochim. 1968, 76, 373-374
- 194 - SJOVALL (K) et JERGIL (B)
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1966, 18, 550-552
- 195 - VAN DER HELM (H.J), ZONDAG (H.A), HARTOG (H.A.Ph) et VAN DER KOOI (M.W)
Clin. Chim. Acta. 1962, 7, 540-544
- 196 - EPPENBERGER (H.M), EPPENBERGER (M), RICHTERICH (R) et AEBI (H)
Developmental Biology. 1964, 10, 1-16
- 197 - ROOS (F), GONAND (J.P) et SIEST (G)
Pharmacien Biologiste. 1967, 5, 177-180
- 198 - ESTBORN (B)
Z. Klin. Chem. 1964, 2, 53-54
- 199 - KLEINER (H) et GRAFF (G)
C. R. Soc. Biol. 1966, 160, 714-717
- 200 - SOBER (H.A), GUTTER (F.J), WICKOFF (M.M) et PETERSON (E.A)
J. Am. Chem. Soc. 1956, 78, 756-763
- 201 - HOSYOYAMA (Y), FUKUDA (Y) et SHIMIDATE (T)
Clin. Chim. Acta. 1967, 18, 141-142
- 202 - DUBO (H), PARK (D.C), PENNINGTON (R.J.T), KALBAG (R.M) et WALTON (J.N)
Lancet. 1967, 7, 743-748
- 203 - RICHTERICH (R), SCHAFROTH (P) et AEBI (H)
Clin. Chim. Acta. 1963, 8, 178-192
- 204 - in HENRY (R.J)
Clin. Chem. Principles and Technics - Harper and Row
Publishers - New York. 1964
- 205 - HULE (V)
Résumé des Communications F.E.B.S. Prague. 1968
- 206 - KAR (N.C) et PEARSON (C.M)
Am. J. Clin. Pathol. 1965, 43, 207-209
- 207 - EPPENBERGER (H.M), EPPENBERGER (M), RICHTERICH (R) et AEBI (H)
Developmental Biology. 1964, 10, 1-16

- 208 - GRAIG (F.A) et SMITH (J.C)
Sciences. 1967, 156, 254-255
- 209 - VESELL (E.S), FRITZ (P.J) et WHITE (E.L)
Biochim. Biophys. Acta. 1968, 159, 236-243
- 210 - NISSELBAUM (J.S)
Anal. Biochem. 1968, 23, 173-181
- 211 - HAECKEL (R), HESS (B), LAUTERBORN (W) et WÜSTER (K.H)
Z. Physiol. Chem. 1968, 349, 699-714
- 212 - BAILEY (E), STIRPE (F) et TAYLOR (C.B)
Biochem. J. 1968, 108, 427-436
- 213 - BOYDE (T.R.C)
Biochem. J. 1968, 106, 581-586
- 214 - SCHNEIDER (F) et DÜRR (H)
Z. Physiol. Chem. 1967, 348, 1699-1700
- 215 - RENOLD (A.E)
Rapport 5ème Journées Biochimiques Latines. Monaco. 1968,p.153

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE

ETUDE DES REACTIONS COLOREES ENTRE LES DERIVES GUANIDIQUES ET LES ALPHA-DICETONES
COMPARAISON AVEC UNE REACTION FLUORESCENTE A LA NINHYDRINE.

Introduction	1
CHAPITRE I : Réaction créatine-dioxo-2,3 butane	11
Introduction	11
1 - Dioxo-2,3 butane	11
2 - Alcalinité	15
3 - Alpha-naphtol	16
4 - Cinétique - Stabilité	18
Conclusions	21
CHAPITRE II : Essais de différents adjuvants pour améliorer la réaction créatine-dioxo-2,3 butane	23
1 - Solvants organiques	23
2 - Sels métalliques	25
3 - Composés à caractère oxydant ou réducteur	26
- dérivés à caractère oxydant	26
- composés réducteurs	28
4 - Substances intensifiantes	33
- Intensifiants en milieu alcalin 5 N	34
- Intensifiants en milieu alcalin 0,25 N	39
Conclusions	41
CHAPITRE III : Intérêt de l'addition d'orcinol et de glucuronolactone à la réaction créatine-dioxo-2,3 butane	43
1 - Spectre	44
2 - Alcalinité	44
3 - Dioxo-2,3 butane	44
4 - Orcinol	46
5 - Cinétique - Stabilité	46
Effet de la glucuronolactone sur la réaction développée en présence d'alpha-naphtol	49
Conclusions	50
CHAPITRE IV : Réaction créatine-dioxo-2,3, phényl-3 propane	51
1 - Réaction créatine-dioxo-2,3, phényl-3 propane .	51

	- Dioxo-2,3, phényl-3 propane	51
	- Alcalinité	52
	- Alpha-naphtol	53
	- Cinétique - Stabilité	54
2 -	Action des composés modifiant la réaction	
	créatine-dioxo-2,3, phényl-3 propane	56
	- Solvants organiques	56
	- Sels métalliques	57
	- Composés à caractère oxydant ou réducteur ..	58
	- Intensifiants	59
	Conclusions	66
CHAPITRE V	: Nouvelle réaction colorée créatine-dioxo-2,3 pentane ...	67
1 -	Réaction créatine-dioxo-2,3 pentane	
	alpha-naphtol	67
	- Dioxo-2,3 pentane	67
	- Alcalinité	67
	- Alpha-naphtol	69
	- Cinétique - Stabilité	69
2 -	Réaction créatine-dioxo-2,3 pentane-orcinol ..	71
	- Dioxo-2,3 pentane	71
	- Alcalinité	72
	- Orcinol	72
	- Glucuronolactone	72
	- Cinétique - Stabilité	74
	Conclusions	76
CHAPITRE VI	: Etude comparative des réactions colorées et fluorimé-	
	triques guanidines - dicétones. Méthodes manuelle et	
	automatique	77
1 -	Réaction fluorimétrique créatine-ninhydrine ..	77
	- Conditions de la réaction créatine-ninhydrine	
		77
	- Essais d'amélioration de la sensibilité de	
	la réaction créatine-ninhydrine	81
2 -	Comparaison des réactions guanidines-dicétones	83
3 -	Adaptation des réactions colorées guanidines-	
	alpha dicétones à l'analyse en flux continu ..	86
	- définition des conditions de la réaction ...	86
	- diagramme des flux	87
	- comparaison de la réactivité des alpha-	
	dicétones	87
	Conclusions	91
CHAPITRE VII	: Données sur la nature des complexes colorés et	
	fluorescents	93

1 - Réaction colorée guanidine-dicétone	93
2 - Réaction fluorimétrique créatine-ninhydrine ..	98
Conclusions	102
Choix d'une méthode	103
Annexe : Technique de dosage de la créatine	105

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE LA CREATINEPHOSPHOKINASE

Introduction	107
CHAPITRE VIII : Données actuelles sur les différentes formes de créatinephosphokinase	111
1 - Localisation	111
2 - Répartition cellulaire	112
3 - Extraction	112
4 - Poids moléculaire	113
5 - pH optimum	113
6 - Influence des cations	113
7 - Cinétique de la réaction	114
8 - Stabilité de l'enzyme	115
9 - Spécificité	115
10 - Activateurs	115
11 - Inhibiteurs	116
12 - Structure de l'enzyme	116
CHAPITRE IX : Mesure globale de l'activité de la créatinephospho- kinase sérique	121
A - Méthodes existantes	121
- Dosage du créatinephosphate	121
- Dosage de ADP	123
- Dosage de ATP	123
- Dosage de la créatine	124
B - Mise au point d'une méthode manuelle de mesure de la CPK	126
- concentration des substrats	126
- pH de la réaction	128
- choix des composés à groupement thiol	128
- arrêt de la réaction enzymatique	131
- température - temps d'incubation	131
- volume de la prise d'essai	132

C - Adaptation à l'analyse en flux continu	134
- Conditions de l'analyse	143
- Diagramme des flux	135
- Etalonnage	135
D - Discussion des méthodes de dosage	137
- sensibilité de la réaction	137
- spécificité de la réaction	138
E - Résultats	140
- valeurs normales - variations physiolo-	
giques	140
- variations pathologiques	142
Conclusions	143
CHAPITRE X : Séparation électrophorétique des isoenzymes de la	
créatinephosphokinase du sérum	145
A - Méthodes existantes	145
B - Mode de séparation des isoenzymes de CPK avec	
révélation de la créatine	146
C - Résultats	147
Conclusions	150
CHAPITRE XI : Chromatographie des formes moléculaires multiples de CPK	
.....	151
A - Chromatographie	152
B - Analyse de l'éluat	153
C - Résultats	155
Conclusions	159
CHAPITRE XII : Influence des ions sur l'activité enzymatique	161
Conditions	161
Résultats	162
- CPK musculaire	162
- CPK extraite de l'encéphale	164
Conclusions	168
CHAPITRE XIII : Effet de l'insuline sur l'activité in vitro de la	
créatinephosphokinase	171
A - Conditions opératoires	171
B - Résultats	173
- Effet de l'insuline introduite directement	
dans la réaction enzymatique	173
- Effet de l'insuline après un précontact	
avec l'enzyme	174
C - Discussion	176
Conclusions	177
Conclusions de la deuxième partie	179
Annexe I : Technique de mesure de l'activité de la	
CPK sérique	183

Annexe II : Séparation électrophorétique des iso- enzymes de la créatinephosphokinase	186
CONCLUSIONS GENERALES	189
BIBLIOGRAPHIE	191
TABLE DES MATIERES	205

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

PROCESSUS BIOCHIMIQUES DE LA GLUCURONOCONJUGAISON

UNIVERSITE DE NANCY

FACULTE DE PHARMACIE

T H E S E

Présentée par Françoise ROOS

née à EPINAL (Vosges) le 25 Janvier 1938

Nationalité française

et portant le titre :

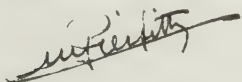
ETUDE DES REACTIONS DES DERIVES GUANIDIQUES AVEC DES ALPHA-DICETONES.

APPLICATION A LA MESURE DE L'ACTIVITE DE LA CREATINEPHOSPHOKINASE.

Vu :

NANCY, le 12.2.69

Le Président de Thèse

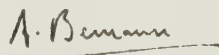


M. PIERFITTE

Vu et Approuvé :

NANCY, le

Le Doyen de la Faculté

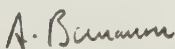


A. BERNANOSE

Vu et permis d'imprimer

NANCY, le

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie



A. BERNANOSE

Cet exemplaire est imprimé
à des fins particulières et ne
peut en aucun cas être vendu.

Achevé d'imprimer le 15 Décembre 1969
à l'Atelier de Documentation Universitaire
3, Rue Sellier, 3 NANCY

Dépôt légal N° 592 Faculté de Pharmacie Editeur
4ème trimestre 1969

